

DE19739120A1: Determination of the antioxidant capacity of samples

Inventors:

Hom, Anton, Prof. Dr.; 07749 Jena, Germany
Marqui, Carlos Pascual; 07743 Jena, Germany
Reinhart, Konrad, Prof. Dr.med.habil.; 07743 Jena, Germany
Poppitz, Elke, Dipl.-Chem.; 07745 Jena, Germany
Bethge, Mathias, Dipl.-Ing.; 07745 Jena, Germany
Borkowski, Annett; 07407 Rudolstadt, Germany

Applicant:

Friedrich-Schiller-Universität Jena, 07743 Jena, Germany

Abstract:

The invention concerns a procedure for the determination of the antioxidant capacity of samples and is in particular used in biochemistry, in the biotechnology, in the medical and industrial research as well as in the food chemistry. It is the task, in as simple a way as possible, to determine the antioxidant capacity of samples fast and in particular without time-consuming analyses. According to invention a plurality of cooled analysis container mixtures made of the samples are arranged in a given x-y-grid, which consist of a system, which forms temperature-dependent free radicals, and an indicator, which radical-dependently changes its optical characteristics.

The mixtures in the cooled analysis containers (1) are first brought to an essentially identical output temperature between 0 and approx. 20°C and afterwards evenly warmed up to a temperature at most up to approx. 90°C. The heating up is made favorably by a heatable metallic base (3), on which a micro titer plate (2) with form-flexible analysis containers (1) mount in the x-y-grid. During the rise in temperature the course of the change of the optical characteristics as well as the antioxidant capacity by comparison with well-known reference values are determined with an actually well-known reader arrangement in the mixtures.

Description:

The invention concerns a procedure for the determination of the antioxidant capacity of samples and in biochemistry, in the biotechnology, in the medical and industrial research as well as in the food chemistry is in particular used. Free radicals arise in animated nature in large material variety with short, strongly different lifetimes and different meaning. On the one hand they are dangerous byproducts, which are formed during the process of the biological oxidation and are able to modify almost all biological groups of materials chemically as well as to cause damage. On the other hand they are formed and used by specialized cells, like leukocytes and macro phages, as helpful tools for the fight against parasites penetrated into the organism in the process of the infection fight, because of their natural outstanding eagerness to react.

There is a complicated balanced equilibrium of oxidants and the regulated formation of antioxidants, formed in the organism. Oxidative stress is compensated or made ineffective by antioxidants, which recruit themselves from low-molecular water or lipid soluble substances such as vitamin C, Glutathion, urine acid, bilirubin, vitamin E, vitamin A etc. or by enzymatic processes, like superoxid sismutase, katalase, glutathionreduktase and gluthadionperoxidase. Disturbances in the antioxidant balance are held accountable for the pathobiochemical mechanisms of the emergence diabetes mellitus, and its symptomatics

(Ceriello A., Bortolotti N., Falletti E., Taboga C., Tonutti L., Crescentini A., Motz E., Lizzio S., Russo A., Bartoli E. Total radical-trapping antioxidant parameter in NIDMM patients. Diabetes Care 1997; 20: 194-197),

for the serious symptomatics of sepsis

(Dasgupta A., Malhotra D., Levy H., Marcadis D., Blackwell W., Johnston D., Decreased total antioxidant capacity but normal lipid hydroperoxide concentrations in sera of critically ill patients. *Life Sci* 1996; 60: 4–5

or also

Cowley H. C., Bacon P. J., Goode H. F., Webster N. R., Jones J. G., Menon D. K. Plasma antioxidant potential in severe sepsis: a comparison of survivors and nonsurvivors. *Crit Care Med* 1996; 24: 1179–1183),

for arteriosclerosis and cardiac infarct

(Westhuyzen J. The oxidation hypothesis of atherosclerosis: An update. *Annals of Clin and Lab Science* (1997); 27: 1–10

or

Miller N. J.; Rice-Evans C. A. Antioxidant activity of resveratrol in red wine. *Clin-Chem.* 1995; 41: 1789

or also

Mulholland C. W.; Strain J. J. Serum total free radical trapping ability in acute myocardial infarction. *Clin-Biochem.* 1991; 24: 437–441),

for substantial problems during the process of aging

(Butterfield D. A., Howard B. J., Yatin S., Allen K. L., Carney J. M. Free radical oxidation of brain proteins in accelerated senescence and its modulation by N-tert-butyl-alpha-phenylnitron. *Proc Nat Acad Sci USA* 1997; 94: 674–678.),

for kidney diseases

(Rohrmoser M. M., Mayer G. Reactive oxygen species and glomerular injury. *Kidney Blood – Press-Res.* 1996; 19: 263–269

or

McGrath L. T.; Douglas A. F.; McClean E.; Brown J. H.; Doherty C. C.; Johnston G. D.; Archbold G. P. Oxidative stress and erythrocyte membrane fluidity in patients undergoing regular dialysis. *Clin-Chim-Acta.* 1995; 235: 179–188

or also

Jackson P.; Loughrey C. M.; Lightbody J. H.; McNamee P. T.; Young I. S. Effect of hemodialysis on total antioxidant capacity and serum antioxidants in patients with chronic renal failure. *Clin-Chem.* 1995; 41: 1135–1138.),

for the emergence of neurodegenerative processes

(Borlongan C. V.; Kanning K.; Poulos S. G.; Freeman T. B.; Cahill D. W.; Sanberg P. R. Free radical damage and oxidative stress in Huntington's disease. *J-Fla-Med-Assoc.* 1996; 83: 335–341

or

Gurney M. E.; Cutting F. B.; Zhai P.; Andrus P. K.; Hall E. D. Pathogenic mechanisms in familial amyotrophic lateral sclerosis due to mutation of Cu, Zn superoxide dismutase. *Pathol-Biol-Paris.* 1996; 44: 51–56),

and for the emergence of some kinds of carcinomas

(Dreher D.; Junod A. F. Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur-J-Cancer*. 1996; 32A: 30–38 oder Pappalardo G.; Guadalaxara A.; Maiani G.; Illomei G.; Trifero M.; Frattaroli F. M.; Mobarhan S. Antioxidant agents and colorectal carcinogenesis: role of beta-carotene, vitamin E and vitamin C. *Tumori*. 1996; 82: 6–11

or also

Kumar K.; Thangaraju M.; Sachdanandam P. Changes observed in antioxidant system in the blood of postmenopausal women with breast cancer. *Biochem-Int*. 1991; 25: 371–380).

The determination of the antioxidant capacity or antioxidant reactivity as diagnostic-analytic parameters keeps becoming increasingly greater importance in the medicine for the diagnostics and to process control for a multiplicity of illnesses.

Wayner et al. (Wayner D. D., Burton G. W., Ingold K. U., Barclay L. R., Locke S. J. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim Biophys Acta* 1987; 924: 408–419) were the first to introduce a method for the determination of the Total Radical Antioxidant of Potential (TRAP) in 1987. In a system, which consisted of a radical source 2,2'-Azo-bis-2-amidinopropan (ABAP), which oxidized a lipid mixture at constant temperature over a constant radical formation rate, the oxygen consumption was measured. After adding antioxidants the induction time of the system up to the renewed oxygen consumption was determined, as well as compared and calibrated with a well-known stoichiometry and reactivity of a reference antioxidant.

In the following time both other sources of radical and other radical indicator systems were adapted and optimized

(Lissi E.; Salim-Hanna M.; Pascual C.; del-Castillo M. D. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free-Radic-Biol-Med*. 1995; 18: 153–158

or

Cao G.; Alessio H. M.; Cutler R. G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic Biol Med* 1994; 16: 135–137

or also

Candy TEG, M Hodgson, P Jones 1990. Kinetics and mechanisms of a chemiluminescent clock reaction based on the horseradish peroxidase catalysed oxidation of luminol by hydrogen peroxide. *J. Chem. Soc Perkin Trans 2*: 1385–1388)

Further publications for this are for example

Uotila J. T.; Kirkkola A. L.; Rorarius M.; Tuimala R. J.; Metsa-Ketela T. The total peroxy radical-trapping ability of plasma and cerebrospinal fluid in normal and preeclamptic parturients. *Free-Radic-Biol-Med*. 1994; 16: 581–590

or

Whitehead T. P., GHG Thorpe, SRJ Maxwell. Enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids. *Analyt. Chimica Acta* 1992; 266: 265–277

or

DeLange R. J.; Glazer A. N. Phycoerythrin fluorescence-based assay for peroxy radicals: a screen for biologically relevant protective agents. *Anal-Biochem*. 1989; 177: 300–306

or also

Thurnham D. I.; Singkamani R.; Kaewichit R.; Wongworapat K. Influence of malaria infection on peroxy-radical trapping capacity in plasma from rural and urban Thai adults. Br-J-Nutr. 1990; 64: 257–271.

Apart from these methods, which measure the induction, after longer or shorter delay, of a signal released in the samples to be characterized by the presence of a radical source, procedures were described, which come out with mark measurements after a certain time. The disadvantage of the well-known methods consists of the fact that they are time-consuming and must be carried out sequentially.

Therefore the basic task of this invention, is to determine the antioxidant capacity of samples in a way as fast and simple as possible and in particular without time-consuming analyses.

The disadvantages of the well-known solutions are avoided according to invention by the fact that the analyses are accomplished parallel in several sets of mixtures, whereby each individual measuring is accomplished in the group by otherwise same boundary conditions. The synchronisation and dosage of the radical formation is caused by programmed rise in temperature with suitable means according to invention. The automated evaluation is caused by entrained and otherwise calibrators equivalent to the sample.

The invention is to be described below on the basis of the examples represented in following experimental setups. The following is shown:

Fig. 1 Sample arrangement of analysis containers (Wells) attached on a heatable base in a 12 × 8-Grid of a micro titer plate;

Fig. 2 Temporal temperature gradient for the defined simultaneous increase of the temperature in analysis containers which are arranged in a 12 × 8-Grid in one period of 8 minutes;

Fig. 3 Temperature gradient of the mixtures in three selected analysis containers of the micro titer plate;

Fig. 4 Evaluation of the analysis results;

Fig. 5 Course of the absorption of ABBOTT with 620 Nm with the radical source ABAP in all 96 Wells of a micro titer plate with different samples during one period of 43 minutes;

Fig. 6 Course of the absorption of ABBOTT with 620 Nm with uric acid and catechine as samples to be examined during one period of 43 minutes;

Fig. 7 Calibration curve of trolox as oxidation reference for the colorimetric determination of the antioxidation capacity with ABAP/ABTS;

Fig. 8 Course of the chemiluminescence of luminol with ABAP as radical source in a matrix of 6X8 analysis containers with different samples in one period of 25 minutes;

Fig. 9 Influence of the addition of additional trolox to the reaction mixture on the process of the chemiluminescence of ABAP/luminol. (H3 without trolox, G4 and H4 with trolox in the reaction mixture);

Fig. 10 Course of the absorption with 620 Nm of a cell system (resistance of erythrocytes opposite ABAP in presence of different trolox concentrations) within one period of 4 hours;

Fig. 11 Calibration curve of trolox as oxidation reference (resistance of a cell system);

Fig. 12 Course of the chemiluminescence of luminol in the system xanthin xanthinoxidasis;

Fig. 13 Calibration of the Xanthin Xanthinoxidase chemiluminescence method with superoxide dismutase as oxidation reference;

Fig. 14 Course of the chemiluminescence of luminol in the system H_2O_2 /Myoglobin as radical pictures;

Fig. 15 Time-dependent shift of the fluorescence wavelength of Ruby after addition of ABAP (Excitation wavelength: 550 nm);

Fig. 16 The influence of different trolox quantities on the beginning of the time-dependent change of the fluorescence of Ruby after addition of ABAP.

For the determination of the antioxidation capacity of samples to be examined mixtures are manufactured, which beside the samples at least contain a system, which forms temperature-dependent free radicals, and an indicator, which radical-dependently changes its optical characteristics.

These mixtures are manufactured by pipetting into analysis containers **1** of an actually well-known micro titer plate **2**. An exemplary sample arrangement of the analysis containers **1** in actually well-known 12×8 -grid the micro titer plate **2** is shown in **Fig. 1**.

The micro titer plate **2** with the analysis containers **1** is put form stable and actuated on a base **3**. By the form-flexible material the analysis containers of the micro titer plate **1** fit themselves **2** into situation-corresponding recesses **4** of the metallic base **3**.

Fig. 1 shows the micro titer plate **2** and the base **3** for the illustration of both more separate and compound representation. The analysis containers **1** with the mixture ingredients are first kept in cooled condition and are each, in order to create approximately same thermal analysis conditions for all mixture ingredients, brought to an essentially identical output temperature between 0 and approx. 20°C .

From this output temperature the mixtures in the analysis containers **1** are warmed up together evenly. For this purpose the base **3** is heatable. **Fig. 1** therefore shows heating coils **5** in the base **3**.

Due to the metallic material of the base **3**, and the associated good thermal conduction, it is evenly warmed up, together with the analysis containers **1**, which have close heat contact in the recesses **4**.

Fig. 2 shows the temperature gradient of the reaction mixture, measured with a thermochromic indicator system

[Schilling K.; Cumme G. A.; Hoffmann-Blume E.; Hoppe H.; Horn A. Multiwavelength photometry of thermochromic indicator solutions for temperature determination in multicuvettes. Clin-Chem. 39/2, 251-256 (1993)],

over a certain period in all 96 analysis containers **1** (Wells) of the micro titer plate **2**. **Fig 3** shows the temporal temperature gradient of three selected positions of the micro titer plate (the positions are shown in the illustration at the top to the right).

From the table in **Fig. 3** it is evident that at an starting temperature of 18°C after approx. 3 minutes the target temperature of 42°C is reached and maintained constantly. According to invention free radicals are formed temperature-dependently in the mixtures due to the radical producing system.

Furthermore, in the mixtures an indicator is contained, by which the optical characteristics of the mixtures in dependence of this radical formation change. With an actually well-known reader arrangement (not represented in the illustration) in all analysis containers the courses of this change of the optical characteristics are recorded and evaluated as follows:

Determination of the deceleration time τ

In **Fig. 4a** the principle of the evaluation of the results of analysis is represented by determination of the deceleration time τ . The antioxidation capacity A_P of the sample causes a temporal delay of the formation of an optical signal of the indicator, which radical-dependently changes its optical characteristics compared to the antioxidation capacity A_0 of the reaction mixture without sample.

The antioxidation capacity A_P of the sample can be standardized over the comparatively accompanying determination of the antioxidation capacity A_S of a standard. From the rising, almost linear part of the curve of the optical signal over the time the deceleration time of the sample (τ_P), the standard (τ_S) and the reaction mixture without sample = blank value (τ_0) can be determined.

For practical reasons it is favourable, to admit a defined small concentration of antioxidants in the reaction mixture in order to guarantee that all radicals are bound during the nonlinear part of the radical formation at the beginning of the rise in temperature and that the change of the optical signal also lies in the blank value in the time-dependently linear part of the radical formation. The antioxidation capacity A_P of the sample can then be calculated by

$$A_P = (\tau_P - \tau_0 / \tau_S - \tau_0) \cdot A_S$$

whereby the antioxidation capacity A_S of the standard result of

$$A_S = C_S \cdot SF.$$

C_S = The concentration of the standard

SF = Stoichiometry factor of the radical formation.

Determination of the integral of the optical signal

In **Fig. 4b** the result of analysis of the determination of the integral of the optical signal is represented. The integral of the optical signal (extinction; Fluorescence; Luminescence) of the signal time curve for the blank value (I_0) for the sample (I_P) and for the standard (I_S) is determined. There is a linear relationship between I_0/I_P and the antioxidation concentration (Stern Vollmer Equation).

By carrying over a standard one can conclude on the antioxidation concentration in the sample. The evaluation of the results of analysis for the determination of the antioxidation capacity, both by the determination of the deceleration time (**Fig. 4a**) and over the determination of the integral of the optical signal (**Fig. 4b**) is supported substantially by suitable software on an evaluation computer.

Experimental set-up example 1

Colorimetric determination of the antioxidation capacity

The radical forming system is 2,2'-Azo-bis-2-amidinopropan (ABAP). This connection produces a significant amount of peroxy radical already at relatively low temperatures and reacts with all substances, which are significant as antioxidants during biological processes.

As indicator, which changes its optical characteristics in presence of free radicals, 2,2'-Azino bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfon acid) (ABTS) is used. The originally colorless solution receives an intensively blue colouring with presence of radicals.

The samples which are to be analyzed are pipetted into the individual wells of the cooled, heatable micro titer plate. The allocation of the individual wells of the micro titer plate are shown in the legend of

Fig. 5. In some wells trolox, a water-soluble vitamin E-derivative with well-known concentration and antioxidation capacity as standard, and/or water is submitted as blank value.

Subsequently, with a 96-time pipette (hedgehog) for each 200 µl cooled, freshly prepared substrate (1,64 mg of ABTS, 54 mg ABAP and 128 µl 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsaeure (trolox (376 µM in water)), solved into 20 ml buffers (2 ml 50 mM of phosphate buffers pH 7.4 and 18 ml 0.9% NaCl), is added, the micro titer plate is vibrated, warmed up to 37°C and measured with an actually well-known micro titer disk reader at 620 nm in certain time intervals and measured in one total period of 43 min as indicated in the example.

The different process of the absorption as a function of the time in all 96 wells of the micro titer plate is represented in **Fig. 5**. A clear graduation of the deceleration time in the individual wells is observed, which passes up to the beginning of the rise of the absorption. In this time the formed radicals of the assigned antioxidants become "captured away", and it comes to no change of the optical characteristics of the ABTS.

The dependence of the deceleration time on the quantity of the trolox used as reference oxidation results in a linear function, like in the calibration curve is represented in **Fig. 7**. The exact starting point of the reaction can be exactly determined by the addition of a defined amount of trolox to the reaction solution, as the time received for the blank value, which contains only the amount of trolox of the reaction solution, is regarded as starting point of the reaction (see also design example 2).

With the help of the provided calibration curve the antioxidation capacity of samples to be examined can be compared with the antioxidation capacity of trolox as default value. In **Fig. 6** the absorption process by time is shown with different quantities by the example of A) uric acid and b) catechin. The position of the individual wells in the micro titer plate in each case can be seen in the summary presentation in the top right of **Fig. 6**.

Experimental set-up example 2

Determination of the antioxidation capacity with chemiluminescence

The radical forming system is similar to the first example of use 2,2'-Azo-bis-2-amidinopropan (ABAP). As indicator, which changes radical-dependently its optical characteristics, luminol is used. The samples which are to be analyzed are pipetted into the wells of a cooled micro titer plate. Water or sodium chlorid solution (0,9%) is filled in one or more wells. These wells, which do not contain samples, serve to determine the starting point of the reaction (blank value).

The reaction solution consists of 12,5 ml 0.1 M glycine buffer (pH 8.6) with 15,6 µl 10 mM of luminol and 34 mg ABAP and is cooled to a temperature within the range of 40 to 150 °C. In the end 10 to 20 µl 300 to 500 µM 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbon acid (trolox) is also added to this solution.

100 to 200 µl of the above reaction solution, which has a temperature between 4°C and 15°C, is pipetted into the samples in the Wells. Due to the cooling of samples and reaction solution no significant consumption of antioxidants is to be registered.

The plate is brought into an actually well-known micro titer disk reader and heated up to 37°C. In a period of 25 minutes in fixed time intervals the chemiluminescence of the indicator luminol is measured and indicated as random luminescence units per second (RLU/sec). The reaction starts during the heating phase. During this time the additionally added trolox is used. The first signal appears in the wells with blank samples.

Fig. 8 shows the temporally different beginning of the chemiluminescence in the whole of the analysis containers with different samples described in the legend. In the wells B1 to B6 different quantities of 376 µM trolox are carried over as antioxidation reference, to which the other samples are referred in their antioxidation capacity.

The results of measurement of the different samples differ both at the time of the beginning of the chemiluminescence and in the intensity of the noted signal. **Fig. 9** shows the effect of the addition of

additional trolox to the reaction mixture for the determination of the accurate starting point of the reaction.

The upper curve H3 was obtained without addition of trolox to the reaction solution. It is characterized by a comparatively flat rise of the chemiluminescence from the time "0", which is due to the temperature gradient in the heating phase.

In contrast to this the curves G4 and H4 contained trolox in the reaction mixture. Until this additional trolox is "used up", as expected no chemiluminescence is observed, and the curve moves on the "zero value". At the time of the complete consumption of the additional trolox the reaction temperature is reached, and thus a steep rise of the chemiluminescence is made possible.

The additional trolox in the reaction mixture is of practical importance and facilitates the evaluation of the results of measurement. It catches the radicals at the beginning of the reaction away, when no constant radical formation takes place yet, due to the temperature gradient. If the trolox is used up in the reaction mixture, the reaction temperature is also reached and one receives a sharp and precise evaluable starting point of the reaction.

Experimental set-up example 3

Determination of the antioxidation capacity of a cell system (erythrocytes)

The colorimetric determination of the antioxidation capacity of a cell system takes likewise place with 2,2'-Azo-bis-2-amidinopropan (ABAP) as radical formation system. The erythrocyte suspension is used as one of its optical characteristics changing indicator.

The measured absorption wavelengths lie within 620 and 550 Nm. 5 ml blood was taken from a test person with a syringe, which contains Heparin as anticoagulant, and centrifuged 10 minutes at 4°C (2,000 Xg). Afterwards the plasma is taken out carefully with a pipette.

After removal of the intermediate layer from leukocytes and other cells the remaining erythrocytes are washed and centrifuged 3 times with 15 ml 0.9% NaCl solution, in order to remove the remaining plasma completely.

40 µl the erythrocytes are added to 10 ml of a solution consisting of 1 ml 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4) and 9 ml 0.9% NaCl solution. The temperature of the solution lies in the range between 4°C and 10°C. This 0.4% erythrocyte solution is called "suspension 1" in the following.

The haemolysate is created by adding 40 µl of the washed erythrocytes to 10 ml distilled water with a temperature between 4°C and 10°C and is called "suspension 2" in the following. As standard antioxidant 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) in a concentration of 6,4 mg is used in 25 ml 0.9% NaCl solution.

The samples to be examined are pipetted into a micro titer plate. The reaction solution ("ABAP"), consisting of 136 mg ABAP in 3 ml cooled 0.9% NaCl solution, must be freshly prepared directly before the test and must be pipetted into the wells as the last thing.

Differences of the total volumes become balanced by 0,9% NaCl solution. **Fig. 10a** shows the resistance of erythrocytes opposite ABAP as a time-dependent process of the absorption with 620 Nm. The two upper curves (A9 and A10) show the temporal absorption process of the erythrocyte-suspension with and without additive of ABAP.

Curve A10 clarifies the stability of the pure erythrocyte-suspension without additive of ABAP during the entire period of the measurement. Curve A9 represents the reaction of ABAP with the erythrocyte-suspension. The membrane is destroyed by the radicals set free by the ABAP, the haemolysis uses, and it is followed by an approximating to the curve A11, which shows the effect of ABAP on the haemolysate (suspension 2).

The formed radicals cause the formation of methaemoglobin. Curve A12 illustrates the stability of the haemolysate during the entire period of the measurement. **Fig. 9b** and **9c** show the protective effect of antioxidants, by the example of Trolox in form of a later occurring haemolysis and/or methaemoglobin formation. In **Fig. 11** it is shown that a linear connection exists between the assigned amount of Trolox and the time, which passes up to the occurrence of haemolysis.

Experimental set-up example 4

Xanthin-Xanthinoxidase-Luminol-Chemiluminescence method for determination of Superoxide radical capture

Hypoxanthine and the enzyme xanthinoxidase form peroxide radicals. Luminol is also used as indicator. If one adds the enzyme superoxid dismutase (SOD) to the reaction solution, the radical formation as a function of the added quantity is reduced and the intensity of the chemiluminescence decreases.

Into the individual wells of a cooled micro titer plate spatially separate from each other the different samples and each 2 µl xanthinoxidase (20 Units/ml into 20 ml 0.9% NaCl) are pipetted. After that in each case 100 µl of the reaction solution, consisting of 9 ml 0.1 M glycine buffer pH 7.4 with 1 ml 10 mm hypoxanthine and 15 µl 10 mm of luminol are added into each analysis container.

The micro titer plate is placed into an actually well-known micro titer disk reader, vibrated as well as warmed up to 37°C. In one period of 15 minutes in given time intervals the chemiluminescence is measured in each case. In **Fig. 12** the measured progress of the chemiluminescence is laid out as a function of the time.

As seen in the legend, standard different quantities of SOD with different activities were examined. A clear reduction of the intensity of the chemiluminescence can be observed in samples with higher activity compared to those with lower activity.

According to the Stern-Volmer-equation I_0/I_i , whereby I_0 is the integral of the chemiluminescence in the absence and I_i is the integral of the chemiluminescence in the presence of SOD, against the SOD activity, one receives a linear dependence. (**Fig. 13**). This can be used for the determination of the antioxidant capacity for the samples to be examined.

Experimental set-up example 5

Reaction of H₂O₂ with myoglobin

H₂O₂/myoglobin is used as radical forming system and luminol, which changes its optical characteristics (chemiluminescence) radical-dependently is used as indicator. The reaction mixture consists 0.1 M glycine buffer pH 8.6 with 75 µl H₂O₂ (6 µl 30% H₂O₂ of 12,5 ml to 10 ml dest. water), 250 µl myoglobin (1 mg in 1 ml 0.9% NaCl) and 15.6 µl 10 mm of luminol.

1 to 5 µl of the samples to be examined and/or the standard are pipetted into the wells of the cooled micro titer plate. In addition 200 µl of the reaction solution specified above is added to each and the chemiluminescence is measured in an actually well-known micro titer disk reader at 37°C.

Fig. 14 shows the progress of the chemiluminescence in the individual wells of the micro titer plate. In the legend the samples are designated in detail. The determination of the antioxidant capacity of samples is made by the measured deceleration time with a well-known standard, e.g. trolox.

Experimental set-up example 6

Fluorometric determination of the antioxidant capacity

The radical forming substance is 2,2'-azo-bis-2-amidinopropan (ABAP); as an indicator, which its optical characteristics changes radical-dependently (fluorescence), a coloring material is used, consisting of poly-(benzylidimethylvinyl- benzylammoniumchlorid) and sulforhodamin 101 (Ruby).

The reaction solution consists of 170 mg ABAP and 100 μ l Ruby as fluorescence indicator in 20 ml buffer solution (1 part of 50 mm of phosphate buffers pH 7.4 and 9 parts of 0.9% NaCl) and must be freshly prepared directly before the use (temperature: 4-15°C). The samples to be analyzed are pipetted into the wells of a micro titer plate. Water or a NaCl solution is used for the determination of the blank value.

200 μ l of the reaction solution are pipetted into the each of individual wells with the samples to be analyzed. The plate is heated up and the fluorescence is measured immediately in an actually well-known micro titer disk reader on 37°C, and at 570 nm with an excitation wavelength of 550 nm in certain time intervals.

A solvent of a solution of Ruby in water fluoresces at a wavelength of approx. 604 nm (excitation wavelength: 550 nm). With the later recorded wavelength of 570 nm only a small fluorescence is to be observed.

Fig. 15 shows how the fluorescence wavelength shifts time-dependently toward smaller wavelengths with simultaneous increase of the intensity after addition of ABAP, which suggests an influence of the indicator by ABAP. The beginning of the time-dependent shift of fluorescence is affected by addition of antioxidants, e.g. trolox (388 μ M).

The influence of different amounts of Trolox is shown in Fig. 16. Fluorescence was measured at 570 nm (excitation wavelength: 550 nm). The dependence of the time delay on the amounts of Trolox results in a linear connection (not represented) and is likewise suitable over the deceleration time for the determination of the antioxidant capacity of samples to be examined.

Reference symbol list

- 1 Wells
- 2 Micro titer plate
- 3 Base
- 4 Recesses
- 5 Heating coils
- A_p Antioxidant capacity of sample
- A_0 Antioxidant capacity of reaction solution without sample
- A_s Antioxidant capacity of standard
- τ Deceleration time
- τ_p Deceleration time of sample
- τ_s Deceleration time of standard
- τ_0 Deceleration time of reaction solution without sample
- C_s Concentration of standard
- SF Stoichiometry factor of the radical formation
- I_0 Integral of the optical signal for the reaction mixture without sample additive
- I_p Integral of the optical signal for the sample
- I_s Integral of the optical signal for the standard

Claims

1. Procedure for the determination of the antioxidant capacity in samples, **characterized thereby** that mixtures are manufactured with the samples in a plurality of cooled analysis containers arranged in a given XY grid, which further in each case consist of

- a) at least one system, which forms free radicals temperature-dependently
- and
- b) at least one indicator, which changes its optical characteristics radical-dependently,

that the mixtures in the cooled analysis containers first are brought to an essentially identical analysis output temperature between 0 and approx. 20°C and warmed up afterwards, preferably in one period up to 60 min., evenly to a temperature up to approx. 90°C at the most,

that during the heating up of the mixtures in the analysis containers with an actually well-known reader arrangement in the mixtures, the progress of the change of the optical characteristics are measured, and that from this change the antioxidant capacity is determined by comparison with well-known reference values.

2. Procedure according to claim 1, characterized by the fact that at least one of the analysis containers with a substance with defined antioxidant capacity in a reference mixture is exposed to the same rise in temperature as the mixtures whose antioxidant capacity is to be determined,

and that the antioxidant capacity of the mixtures to be determined is determined over the change of their optical characteristics in comparison to the change of the optical characteristics in the reference mixture.

3. Procedure according to claim 1, characterized by the fact that 2,2'-Azo-bis-2-amidinopropan (ABAP) is used as temperature-dependent free radicalforming system.

4. Procedure according to claim 1, characterized by the fact that the temperature-dependent free radicalforming system of the mixtures is formed as substrate from Xanthinoxidasis with Hypoxanthine.

5. Procedure according to claim 1, characterized by the fact that H₂O₂ is used as the temperature-dependent free radicalforming system

6. Procedure according to claim 1, characterized by the fact that Luminol is used as an indicator, which changes its optical characteristics radical-dependently.

7. Procedure according to claim 1, characterized by the fact that 2,2' Azino bis(3 ethylbenzthiazolin 6 sulfon acid) (ABTS) is used as an indicator, which changes its optical characteristics radical-dependently.

8. Procedure according to claim 1, characterized by the fact that an erythrocyte suspension is used as an indicator, which changes its optical characteristics radical-dependently.

9. Procedure according to the claims 1, 3 and 6 and/or 7 characterized by the fact that in all reaction mixtures of an analysis beginning a defined small antioxidant concentration is adjusted in the comparison to the sample and the standard.

10. Procedure according to claim 1, characterized by the fact that Poly-(benzyl dimethyl vinyl benzyl ammoniumchlorid) and Sulforhodamin 101 (Ruby) is used as an indicator, which changes its optical characteristics radical-dependently.

11. Procedure according to claim 1, characterized by the fact that the temperature of the mixtures is increased precipitously.

12. Procedure according to claim 1, characterized by the fact that the temperature of the mixtures is increased continuously.

13. Procedure according to claim 1, characterized by the fact that the temperature of the mixtures is increased with concave temperature time function.

14. Procedure according to claim 1, characterized by the fact that the temperature of the mixtures is increased with convex temperature time function.

15. Device for the execution of the procedure according to claim 1, characterized by the fact that the analysis containers (1) are arranged in situation-corresponding recesses (4) in an XY grid of an actually well-known micro titer plate (2) consist of form-flexible material, and is placed force and shape consistently in a metallic base (3) which can be temperature adjusted.

16. Device according to claim 14, characterized by the fact that the base (3) is in thermal contact with means (5) to adjust temperature.

17. Device according to claim 15, characterized by the fact that the means to temperature adjust the base (3) consist of electrical heating elements, for example one or several heating coils attached at the base(5).

18. Device according to claim 15, characterized by the fact that the means to temperature adjust the base (3) consist of fluid media, e.g. water, which flows through the base (3).

19. Device according to claim 14, characterized by the fact that in order to perform colorimetric measurements of the mixtures, the analysis containers (1) consist of translucent material and the recesses (4) are created as penetrating drillings in the base (3).



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

Offenlegungsschrift DE 197 39 120 A 1

21 Aktenzeichen: 197 39 120.6
22 Anmeldetag: 6. 9. 97
43 Offenlegungstag: 11. 3. 99

51 Int. Cl.⁶:
G 01 N 31/22
G 01 N 21/78
G 01 N 1/28
B 01 L 3/00
// G 01 N 21/64, 21/76,
33/02, 33/49

DE 197 39 120 A 1

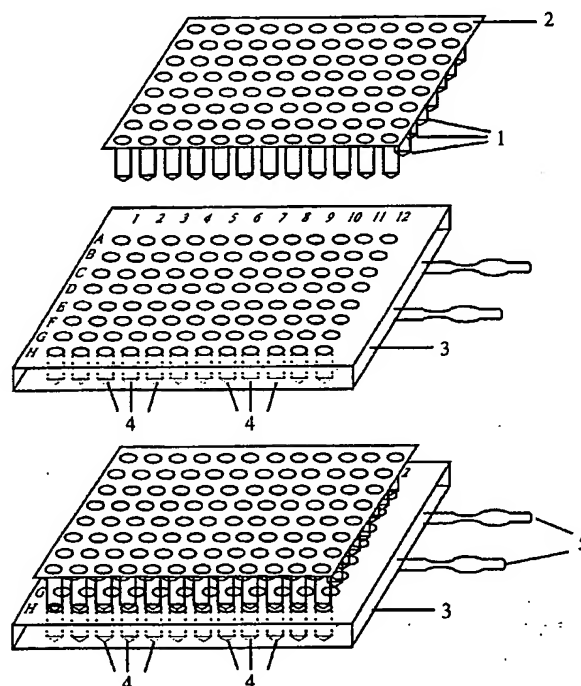
71 Anmelder:
Friedrich-Schiller-Universität Jena, 07743 Jena, DE

72 Erfinder:
Horn, Anton, Prof. Dr., 07749 Jena, DE; Marqui,
Carlos Pascual, 07743 Jena, DE; Reinhart, Konrad,
Prof. Dr.med.habil., 07743 Jena, DE; Poppitz, Elke,
Dipl.-Chem., 07745 Jena, DE; Bethge, Mathias,
Dipl.-Ing., 07745 Jena, DE; Borkowski, Annett,
07407 Rudolstadt, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

54 Verfahren zur Bestimmung der Antioxidanzkapazität von Proben

57 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Antioxidanzkapazität von Proben und wird insbesondere in der Biochemie, in der Biotechnologie, in der medizinischen und industriellen Forschung sowie in der Lebensmittelchemie eingesetzt.
Aufgabe ist es, die Antioxidanzkapazität von Proben auf möglichst einfache Weise, schnell und insbesondere ohne zeitaufwendige Analysen zu bestimmen.
Erfindungsgemäß werden aus den Proben in einer Pluralität von in einem vorgegebenen x-y-Raster angeordneten gekühlten Analysegefäßen Mischungen hergestellt, die weiterhin zumindest jeweils aus einem System, welches temperaturabhängig freie Radikale bildet, und einem Indikator, der radikalabhängig seine optischen Eigenschaften ändert, bestehen. Die Mischungen werden in den gekühlten Analysegefäßen (1) zunächst auf eine im wesentlichen gleiche Ausgangstemperatur zwischen 0 und ca. 20°C gebracht und danach gleichmäßig auf eine Temperatur bis höchstens ca. 90°C erwärmt. Die Erwärmung erfolgt vorteilhaft über einen heizbaren metallischen Grundkörper (3), auf dem eine Mikrotiterplatte (2) mit formnachgiebigen Analysegefäßen (1) im x-y-Raster auf sitzt. Während der Temperaturerhöhung werden mit einer an sich bekannten Readeranordnung in den Mischungen der zeitliche Verlauf der Änderung der optischen Eigenschaften erfaßt sowie daraus die Antioxidanzkapazität durch Vergleich mit bekannten Referenzwerten bestimmt.



DE 197 39 120 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Antioxidanzkapazität von Proben und wird insbesondere in der Biochemie, in der Biotechnologie, in der medizinischen und industriellen Forschung sowie in der Lebensmittelchemie eingesetzt.

Freie Radikale treten in der belebten Natur in einer großen stofflichen Vielfalt mit kurzen, stark verschiedenen Lebenszeiten und unterschiedlicher Bedeutung auf. Einerseits sind sie gefährliche Beiprodukte, die im Prozeß der biologischen Oxidation gebildet werden und in der Lage sind, nahezu alle biologischen Stoffgruppen chemisch zu modifizieren, sowie zu schädigen. Andererseits werden sie wegen ihrer herausragenden Reaktionsfreudigkeit von der Natur als hilfreiche Werkzeuge zur Bekämpfung von in den Organismus eingedrungenen Schädlingen durch spezialisierte Zellen, wie Leukozyten und Makrophagen, im Prozeß der Infektionsbekämpfung gebildet und eingesetzt. Es besteht ein kompliziert ausgewogenes Gleichgewicht von im Organismus gebildeten Oxidantien und der geregelten Bildung von Antioxidantien. Oxidativer Streß wird durch Antioxidantien, welche sich aus niedermolekularen wasser- oder lipidlöslichen Substanzen wie Vitamin C, Glutathion, Harnsäure, Bilirubin, Vitamin E, Vitamin A u. a. rekrutieren kompensiert oder durch enzymatische Prozesse, wie Superoxid-Dismutase, Katalase, Glutathionreduktase und Glutathionperoxidase, unwirksam gemacht.

Störungen in der Antioxidanzbalance werden für die pathobiochemischen Mechanismen der Entstehung des Diabetes mellitus, und seiner Symptomatik (Ceriello A., Bortolotti N., Falletti E., Taboga C., Tonutti L., Crescentini A., Motz E., Lizzio S., Russo A., Bartoli E. Total radical-trapping antioxidant parameter in NIDMM patients. *Diabetes Care* 1997; 20: 194–197), für die schwere Symptomatik der Sepsis (Dasgupta A., Malhotra D., Levy H., Marcadis D., Blackwell W., Johnston D., Decreased total antioxidant capacity but normal lipid hydroperoxide concentrations in sera of critically ill patients. *Life Sci* 1996; 60: 4–5 oder auch Cowley H. C., Bacon P. J., Goode H. F., Webster N. R., Jones J. G., Menon D. K. Plasma antioxidant potential in severe sepsis: a comparison of survivors and nonsurvivors. *Crit Care Med* 1996; 24: 1179–1183), für Arteriosklerose und Herzinfarkt (Westhuyzen J. The oxidation hypothesis of atherosclerosis: An update. *Annals of Clin and Lab Science* (1997); 27: 1–10 oder Miller N. J.; Rice-Evans C. A. Antioxidant activity of resveratrol in red wine. *Clin-Chem.* 1995; 41: 1789 oder auch Mulholland C. W.; Strain J. J. Serum total free radical trapping ability in acute myocardial infarction. *Clin-Biochem.* 1991; 24: 437–441), für wesentliche Probleme im Prozeß des Alterns (Butterfield D. A., Howard B. J., Yatin S., Allen K. L., Carney J. M. Free radical oxidation of brain proteins in accelerated senescence and its modulation by N-tert-butyl-alpha-phenylnitronc. *Proc Nat Acad Sci USA* 1997; 94: 674–678.), für Nierenerkrankungen (Rohrmoser M. M., Mayer G. Reactive oxygen species and glomerular injury. *Kidney Blood – Press-Res.* 1996; 19: 263–269 oder McGrath L. T.; Douglas A. F.; McClean E.; Brown J. H.; Doherty C. C.; Johnston G. D.; Archbold G. P. Oxidative stress and erythrocyte membrane fluidity in patients undergoing regular dialysis. *Clin-Chim-Acta.* 1995; 235: 179–188 oder auch Jackson P.; Loughrey C. M.; Lightbody J. H.; McNamee P. T.; Young I. S. Effect of hemodialysis on total antioxidant capacity and serum antioxidants in patients with chronic renal failure. *Clin-Chem.* 1995; 41: 1135–1138.), für die Entstehung von neurodegenerativen Prozessen (Borlongan C. V.; Kanning K.; Poulos S. G.; Freeman T. B.; Cahill D. W.; Sanberg P. R. Free radical da-

mage and oxidative stress in Huntington's disease. *J-Fla-Med-Assoc.* 1996; 83: 335–341 oder Gurney M. E.; Cutting F. B.; Zhai P.; Andrus P. K.; Hall E. D. Pathogenic mechanisms in familial amyotrophic lateral sclerosis due to mutation of Cu, Zn superoxide dismutase. *Pathol-Biol-Paris.* 1996; 44: 51–56), und für die Entstehung einiger Arten von Karzinomen (Dreher D.; Junod A. F. Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur-J-Cancer.* 1996; 32A: 30–38 oder Pappalardo G.; Guadalajara A.; Maiani G.; Illomei G.; Trifero M.; Frattaroli F. M.; Mobarhan S. Antioxidant agents and colorectal carcinogenesis: role of beta-carotene, vitamin E and vitamin C. *Tumori.* 1996; 82: 6–11 oder auch Kumar K.; Thangaraju M.; Sachdanandam P. Changes observed in antioxidant system in the blood of postmenopausal women with breast cancer. *Biochem-Int.* 1991; 25: 371–380) verantwortlich gemacht.

Die Bestimmung der Antioxidanzkapazität oder Antioxidanzreaktivität als diagnostisch-analytischer Parameter erhält in der Medizin für die Diagnostik und zur Verlaufskontrolle für eine Vielzahl von Erkrankungen zunehmend größere Bedeutung.

Wayner und Mitarbeiter (Wayner D. D., Burton G. W., Ingold K. U., Barclay L. R., Locke S. J. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxyl radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim Biophys Acta* 1987; 924: 408–419) waren die ersten, die 1987 eine Methode zur Bestimmung des Totalen Radical Antioxidanz Potentials (TRAP) eingeführt haben. In einem System, das aus einer Radikalquelle 2,2'-Azo-bis-2-amidinopropan (ABAP) bestand, welche bei gleichbleibender Temperatur über eine konstante Radikalbildungsrate eine Lipidmischung oxidierte, wurde die Sauerstoffkonsumption gemessen. Nach Zusatz von Antioxidantien wurde die Induktionszeit des Systems bis zum erneuten Sauerstoffverbrauch bestimmt, sowie mit einem Referenzantioxidanz bekannter Stöchiometrie und Reaktivität verglichen und kalibriert. In der Folgezeit sind sowohl andere Radikalquellen als auch andere Radikalindikatorsysteme adaptiert und optimiert worden (Lissi E.; Salim-Hanna M.; Pascual C.; del-Castillo M. D. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free-Radic-Biol-Med.* 1995; 18: 153–158 oder Cao G.; Alessio H. M.; Cutler R. G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic Biol Med* 1994; 16: 135–137 oder auch Candy TEG, M Hodgson, P Jones 1990. Kinetics and mechanisms of a chemiluminescent clock reaction based on the horseradish peroxidase catalysed oxidation of luminol by hydrogen peroxide. *J. Chem. Soc Perkin Trans 2:* 1385–1388). Weitere Veröffentlichungen hierzu sind beispielsweise Uotila J. T.; Kirkkola A. L.; Rorarius M.; Tuimala R. J.; Metsa-Ketela T. The total peroxyl radical-trapping ability of plasma and cerebrospinal fluid in normal and preeclamptic parturients. *Free-Radic-Biol-Med.* 1994; 16: 581–590 oder Whitehead T. P., GHG Thorpe, SRJ Maxwell. Enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids. *Analyt. Chimica Acta* 1992; 266: 265–277 oder DeLange R. J.; Glazer A. N. Phycoerythrin fluorescence-based assay for peroxy radicals: a screen for biologically relevant protective agents. *Anal-Biochem.* 1989; 177: 300–306 oder auch Thurnham D. I.; Singkamani R.; Kaewichit R.; Wongworapat K. Influence of malaria infection on peroxyl-radical trapping capacity in plasma from rural and urban Thai adults. *Br-J-Nutr.* 1990; 64: 257–271.

Neben diesen Methoden, die in den zu charakterisierenden Proben nach längerer oder kürzerer Verzögerung die Induktion eines durch die Präsenz einer Radikalquelle ausge-

lösten Signals messen, sind Verfahren beschrieben worden, die mit Einmalmessungen nach einer bestimmten Zeit auskommen. Der Nachteil der bisher bekannten Methoden besteht darin, daß sie zeitaufwendig und sequentiell durchgeführt werden müssen.

Der Erfindung liegt deshalb die Aufgabe zu Grunde, die Antioxidanzkapazität von Proben auf möglichst einfache Weise, schnell und insbesondere ohne zeitaufwendige Analysen zu bestimmen.

Die Nachteile der bekannten Lösungen werden erfindungsgemäß dadurch umgangen, daß die Analysen parallel in Sätzen von Pluralitäten von Mischungen durchgeführt werden, wobei jede Einzelmessung im Verbund von sonst gleichen Randbedingungen durchgeführt wird. Die Synchronisation und Dosierung der Radikalbildung erfolgt durch programmierte Temperaturerhöhung mit geeigneten erfindungsgemäßen Mitteln. Die automatisierte Auswertung erfolgt über mitgeführte und ansonsten wie die Probe gleichbehandelte Kalibratoren.

Die Erfindung soll nachstehend anhand von in den Zeichnungen dargestellten Ausführungsbeispielen näher erläutert werden.

Es zeigen:

Fig. 1 Probenanordnung der auf einem beheizbaren Grundkörper angebrachten Analysengefäße (Wells) in einem 12 × 8-Raster einer Mikrotiterplatte;

Fig. 2 zeitlicher Temperaturverlauf zur definierten simultanen Erhöhung der Temperatur in den im 12 × 8-Raster angeordneten Analysengefäßen in einem Zeitraum von 8 Minuten;

Fig. 3 Temperaturverlauf der Mischungen in drei ausgewählten Analysengefäßen der Mikrotiterplatte;

Fig. 4 Auswertung der Analysenergebnisse;

Fig. 5 zeitlicher Verlauf der Absorption von ABTS bei 620 nm mit der Radikalquelle ABAP in allen 96 Wells einer Mikrotiterplatte mit unterschiedlichen Proben über einen Zeitraum von 43 Minuten;

Fig. 6 zeitlicher Verlauf der Absorption von ABTS bei 620 nm mit Harnsäure und Catechin als zu untersuchende Proben über einen Zeitraum von 43 Minuten;

Fig. 7 Eichkurve von Trolox als Referenzantioxidanz für die colorimetrische Bestimmung der Antioxidanzkapazität mit ABAP/ABTS;

Fig. 8 zeitlicher Verlauf der Chemilumineszenz von Luminol mit ABAP als Radikalquelle in einer Matrix von 6X8 Analysengefäßen mit unterschiedlichen Proben in einem Zeitraum von 25 Minuten;

Fig. 9 Einfluß der Zugabe von zusätzlichem Trolox zur Reaktionsmischung auf den Verlauf der Chemilumineszenz von ABAP/Luminol. (H3 ohne Trolox, G4 und H4 mit Trolox in der Reaktionsmischung);

Fig. 10 zeitlicher Verlauf der Absorption bei 620 nm eines Zellsystems (Resistenz von Erythrozyten gegenüber ABAP in Gegenwart unterschiedlicher Trolox-Konzentrationen) innerhalb eines Zeitraumes von 4 Stunden;

Fig. 11 Eichkurve von Trolox als Referenzantioxidanz (Resistenz eines Zellsystems);

Fig. 12 zeitlicher Verlauf der Chemilumineszenz von Luminol im System Xanthin-Xanthinoxidase;

Fig. 13 Kalibrierung der Xanthin-Xanthinoxidase-Chemilumineszenzmethode mit Superoxid-Dismutase als Referenzantioxidanz;

Fig. 14 zeitlicher Verlauf der Chemilumineszenz von Luminol im System H_2O_2 /Myoglobin als Radikalbilder;

Fig. 15 zeitabhängige Verschiebung der Fluoreszenzwellenlänge von Ruby nach Zugabe von ABAP (Excitationswellenlänge: 550 nm);

Fig. 16 der Einfluß von unterschiedlichen Troloxmengen

auf den Beginn der zeitabhängige Änderung der Fluoreszenz von Ruby nach Zugabe von ABAP.

Zur Bestimmung der Antioxidanzkapazität von zu untersuchenden Proben werden Mischungen hergestellt, die neben den Proben zumindest ein System, welches temperaturabhängig freie Radikale bildet, und einen Indikator, der radikalabhängig seine optischen Eigenschaften ändert, enthalten. Diese Mischungen werden durch Pipettierung in Analysengefäße 1 einer an sich bekannten Mikrotiterplatte 2 hergestellt. Eine beispielhafte Probenanordnung der Analysengefäße 1 in einem an sich bekannten 12 × 8-Raster der Mikrotiterplatte 2 zeigt **Fig. 1**. Die Mikrotiterplatte 2 mit den Analysengefäßen 1 wird auf einen Grundkörper 3 form- und kraftschlüssig aufgesetzt. Durch das formnachgiebige Material passen sich die Analysengefäße 1 der Mikrotiterplatte 2 in lagekorrespondierende Vertiefungen 4 des metallischen Grundkörpers 3 ein. **Fig. 1** zeigt die Mikrotiterplatte 2 und den Grundkörper 3 zur Veranschaulichung sowohl in separater als auch zusammengesetzter Darstellung. Die Analysengefäße 1 mit den Mischungsansätzen befinden sich zunächst im gekühlten Zustand und werden jeweils, um für alle Mischungsansätze annähernd gleiche thermische Analysenbedingungen zu schaffen, auf eine im wesentlichen gleiche Ausgangstemperatur zwischen 0 und ca. 20°C gebracht. Von dieser Ausgangstemperatur aus werden die Mischungen in den Analysengefäßen 1 gemeinsam gleichmäßig erwärmt. Zu diesem Zweck ist der Grundkörper 3 beheizbar. In **Fig. 1** sind deshalb Heizspiralen 5 im Grundkörper 3 angedeutet. Auf Grund der metallischen Ausführung des Grundkörpers 3 und der damit verbundenen guten Wärmeleitung wird dieser, einschließlich der in den Vertiefungen 4 mit engem Wärmekontakt aufgenommenen Analysengefäße 1, gleichmäßig erwärmt.

Fig. 2 zeigt den Temperaturverlauf der Reaktionsmischung, gemessen mit einem thermochromen Indikatorsystem [Schilling K.; Cumme G. A.; Hoffmann-Blume E.; Hoppe H.; Horn A. Multiwavelength photometry of thermochromic indicator solutions for temperature determination in multicuvettes. Clin-Chem. 39/2, 251-256 (1993)], über einen bestimmten Zeitraum in allen 96 Analysengefäßen 1 (Wells) der Mikrotiterplatte 2. Den zeitlichen Temperaturverlauf von drei ausgewählten Positionen der Mikrotiterplatte (die Positionslagen sind oben rechts in der Abbildung dargestellt) zeigt **Fig. 3**. Aus der Tabelle in **Fig. 3** ist ersichtlich, daß bei einer Ausgangstemperatur von 18°C nach ca. 3 Minuten die Solltemperatur von 42°C erreicht und konstant beibehalten wird.

Erfindungsgemäß werden in den Mischungen durch das radikalbildende System temperaturabhängig freie Radikale gebildet. In den Mischungen ist ferner ein Indikator enthalten, durch den sich in Abhängigkeit dieser Radikalbildung die optischen Eigenschaften der Mischungen ändern. Mit einer an sich bekannten Readeranordnung (nicht in der Zeichnung dargestellt) werden in allen Analysengefäßen die zeitlichen Verläufe dieser Änderung der optischen Eigenschaften erfaßt und folgendermaßen ausgewertet:

Bestimmung der Verzögerungszeit τ

In **Fig. 4a** ist das Prinzip der Auswertung der Analysenergebnisse durch Bestimmung der Verzögerungszeit τ dargestellt. Die Antioxidanzkapazität A_p der Probe bewirkt im Vergleich zur Antioxidanzkapazität A_0 der Reaktionsmischung ohne Probe eine zeitliche Verzögerung der Ausbildung eines optischen Signals des Indikators, welcher radikalabhängig seine optischen Eigenschaften ändert. Die Antioxidanzkapazität A_p der Probe kann über die vergleichsweise mitgeführte Bestimmung der Antioxidanzkapazität

A_S eines Standards normiert werden. Aus dem ansteigenden, nahezu linearen Teil der Kurve des optischen Signals über der Zeit können die Verzögerungszeiten der Probe (τ_p), des Standards (τ_s) und der Reaktionsmischung ohne Probe = Blindwert (τ_0) bestimmt werden. Aus praktischen Gründen ist es vorteilhaft, der Reaktionsmischung eine definierte, kleine Konzentration von Antioxidantien zuzugeben, um sicherzustellen, daß während des nichtlinearen Teils der Radikalbildung zu Beginn der Temperaturerhöhung alle Radikale gebunden werden und der Umschlag des optischen Signals auch im Blindwert im zeitabhängig linearen Teil der Radikalbildung liegt. Die Antioxidanzkapazität A_p der Probe kann dann aus

$$A_p = \left(\frac{\tau_p - \tau_0}{\tau_s - \tau_0} \right) \cdot A_s$$

errechnet werden, wobei sich die Antioxidanzkapazität A_s des Standards aus

$A_s = C_s \cdot SF$ ergibt.

C_s = Konzentration des Standards

SF = Stöchiometriefaktor der Radikalbildung.

Bestimmung des Integrals des optischen Signals

In Fig. 4b ist die Auswertung des Analysenergebnisses über die Bestimmung des Integrals des optischen Signals dargestellt. Es wird das Integral des optischen Signals (Extinktion; Fluoreszenz; Lumineszenz) der Signal-Zeit-Kurve für den Blindwert (I_0) für die Probe (I_p) und für den Standard (I_s) bestimmt. Es besteht eine lineare Beziehung zwischen I_0/I_p und der Antioxidanzkonzentration (Stern Vollmer Gleichung). Durch Mitführung eines Standards kann auf die Antioxidanzkonzentration in der Probe geschlossen werden.

Die Auswertung der Analysenergebnisse zur Bestimmung der Antioxidanzkapazität, sowohl durch die Bestimmung der Verzögerungszeit (Fig. 4a) als auch über die Bestimmung des Integrals des optischen Signals (Fig. 4b) wird wesentlich durch geeignete Software auf einem Auswerterechner unterstützt.

Ausführungsbeispiel 1

Colorimetrische Bestimmung der Antioxidanzkapazität

Das radikalbildende System ist 2,2'-Azo-bis-2-amidinopropan (ABAP). Diese Verbindung produziert schon bei relativ niedrigen Temperaturen eine signifikante Peroxylradikalmenge und reagiert mit allen Substanzen, die als Antioxidantien in biologischen Prozessen eine Bedeutung haben.

Als Indikator, der in Gegenwart von freien Radikalen seine optischen Eigenschaften ändert, wird 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) verwendet. Die ursprünglich farblose Lösung erhält bei Anwesenheit von Radikalen eine intensiv blaue Färbung.

Die zu analysierenden Proben werden in die einzelnen Wells der gekühlten, beheizbaren Mikrotiterplatte pipettiert. Die Belegung der einzelnen Wells der Mikrotiterplatte sind in der Legende von Fig. 5 aufgezeigt. In einigen Wells wird Trolox, ein wasserlösliches Vitamin E-Derivat mit bekannter Konzentration und Antioxidanzkapazität als Standard, bzw. Wasser als Blindwert vorgelegt.

Anschließend werden mit einer 96-fach Pipette (Igel) je 200 μ l gekühltes, frisch zubereitetes Substrat (1,64 mg ABTS, 54 mg ABAP und 128 μ l 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure (Trolox) (376 μ M in Was-

ser)), gelöst in 20 ml Puffer (2 ml 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4 und 18 ml 0,9% NaCl), dazu gegeben, die Mikrotiterplatte geschüttelt, auf 37°C erwärmt und mit einem an sich bekannten Mikrotiterplattenreader bei 620 nm in bestimmten Zeitintervallen und einer Gesamtdauer von im Beispiel angegebenen 43 min vermessen.

Der unterschiedliche Verlauf der Absorption in Abhängigkeit von der Zeit in allen 96 Wells der Mikrotiterplatte wird in Fig. 5 dargestellt. Es zeigt sich in den einzelnen Wells eine deutliche Abstufung der Verzögerungszeit, die bis zum Beginn des Anstiegs der Absorption vergeht. In dieser Zeit werden die gebildeten Radikale von den eingesetzten Antioxidantien "weggefangen", und es kommt zu keiner Änderung der optischen Eigenschaften des ABTS. Die Abhängigkeit der Verzögerungszeit von der Menge des als Referenzantioxidanz eingesetzten Trolox ergibt eine lineare Funktion, wie in der Eichkurve in Fig. 7 dargestellt ist. Der genaue Startpunkt der Reaktion läßt sich durch die Zugabe einer definierten Troloxmenge zur Reaktionslösung genau bestimmen, indem der für den Blindwert erhaltene Zeitpunkt, der nur die Troloxmenge der Reaktionslösung enthält, als Startpunkt der Reaktion betrachtet wird (siehe auch Ausführungsbeispiel 2).

Mit Hilfe der erstellten Eichkurve kann die Antioxidanzkapazität von zu untersuchenden Proben mit der Antioxidanzkapazität von Trolox als Standardwert verglichen werden.

In Fig. 6 wird der Absorptionsverlauf mit der Zeit von unterschiedlichen Mengen am Beispiel von a) Harnsäure und b) Catechin gezeigt. Die Position der einzelnen Wells in der Mikrotiterplatte ist jeweils der Übersichtsdarstellung oben rechts in der Fig. 6 zu entnehmen.

Ausführungsbeispiel 2

Bestimmung der Antioxidanzkapazität mit Chemilumineszenz

Das radikalbildende System ist analog zum ersten Anwendungsbeispiel 2,2'-Azo-bis-2-amidinopropan (ABAP). Als Indikator, der radikalabhängig seine optischen Eigenschaften ändert, wird Luminol eingesetzt.

Die zu analysierenden Proben werden in die Wells einer gekühlten Mikrotiterplatte pipettiert. In ein oder mehrere Wells wird Wasser oder Natriumchloridlösung (0,9%) gegeben. Diese Wells, die keine Proben enthalten, dienen zur genauen Bestimmung des Startpunkts der Reaktion (Blindwert).

Die Reaktionslösung besteht aus 12,5 ml 0,1 M Glycinpuffer (pH 8,6) mit 15,6 μ l 10 mM Luminol und 34 mg ABAP und wird auf eine Temperatur im Bereich von 40 bis 150 C gekühlt.

Zu dieser Lösung werden zuletzt noch 10 bis 20 μ l 300 bis 500 μ M 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure (Trolox) gegeben.

100 bis 200 μ l obiger Reaktionslösung, welche eine Temperatur zwischen 4°C und 15°C hat, werden zu den Proben in die Wells pipettiert.

Auf Grund der Kühlung von Proben und Reaktionslösung ist kein signifikanter Verbrauch an Antioxidantien zu verzeichnen.

Die Platte wird in einen an sich bekannten Mikrotiterplattenreader gebracht und auf 37°C erhitzt. In einem Zeitraum von 25 Minuten wird in festgelegten Zeitintervallen die Chemilumineszenz des Indikators Luminol gemessen und als willkürliche Lumineszenzeinheiten pro Sekunde (RLU/sec) angegeben. Die Reaktion startet während der Aufheizphase. In dieser Zeit wird das zusätzlich zugegebene Trolox

verbraucht. Das erste Signal erscheint in den Wells mit Blindproben.

Fig. 8 zeigt den zeitlich unterschiedlichen Beginn der Chemilumineszenz in der Gesamtheit der Analysegefäße mit unterschiedlichen, in der Legende beschriebenen Proben. In den Wells B1 bis B6 werden unterschiedliche Mengen 376 µM Trolox als Referenzantioxidanz, auf den die anderen Proben in ihrer Antioxidanzkapazität bezogen werden, mitgeführt.

Die Meßergebnisse der unterschiedlichen Proben unterscheiden sich sowohl im Zeitpunkt des Beginns der Chemilumineszenz als auch in der Intensität des aufgezeichneten Signals.

Fig. 9 zeigt den Effekt der Zugabe von zusätzlichem Trolox zur Reaktionsmischung für die Bestimmung des exakten Startpunktes der Reaktion. Die obere Kurve H3 wurde ohne Troloxzusatz zur Reaktionslösung erhalten. Sie ist durch einen vergleichsweise flachen Anstieg der Chemilumineszenz vom Zeitpunkt "0" aus charakterisiert, der durch den Temperaturverlauf in der Aufheizphase bedingt ist.

Im Gegensatz dazu enthielten die Kurven G4 und H4 Trolox in der Reaktionsmischung. Bis dieses zusätzliche Trolox "verbraucht" ist, wird erwartungsgemäß keine Chemilumineszenz beobachtet, und die Kurve bewegt sich auf dem "Nullwert".

Zum Zeitpunkt des kompletten Verbrauchs des zusätzlichen Trolox ist die Reaktionstemperatur erreicht, und somit wird ein steiler Anstieg der Chemilumineszenz ermöglicht.

Das zusätzliche Trolox in der Reaktionsmischung ist von praktischer Bedeutung und erleichtert die Auswertung der Meßergebnisse. Es fängt die Radikale zu Beginn der Reaktion weg, wenn noch keine konstante Radikalbildung, auf Grund des Temperaturverlaufs erfolgt. Wenn das Trolox in der Reaktionsmischung verbraucht ist, ist auch die Reaktionstemperatur erreicht und man erhält einen scharfen und präzise auswertbaren Startpunkt der Reaktion.

Ausführungsbeispiel 3

Bestimmung der Antioxidanzkapazität eines Zellsystems (Erythrozyten)

Die colorimetrische Bestimmung der Antioxidanzkapazität eines Zellsystems erfolgt ebenfalls mit 2,2'-Azo-bis-2-amidinopropan (ABAP) als radikalbildendes System. Die Erythrozytensuspension selbst wird als ein seine optischen Eigenschaften ändernder Indikator genutzt. Die gemessenen Absorptionswellenlängen liegen bei 620 und 550 nm.

Einer Versuchsperson wurden 5 ml Blut mit einer Spritze, die Heparin als Antikoagulant enthält, entnommen und 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert (2 000 Xg). Danach wird das Plasma vorsichtig mit einer Pipette abgezogen.

Nach dem Entfernen der Zwischenschicht aus Leukozyten und anderen Zellen werden die verbliebenen Erythrozyten 3 mal mit 15 ml 0,9% NaCl-Lösung gewaschen und zentrifugiert, um noch vorhandenes Plasma vollständig zu entfernen.

40 µl der Erythrozyten werden zu 10 ml einer Lösung bestehend aus 1 ml 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) und 9 ml 0,9% NaCl-Lösung gegeben. Die Temperatur der Lösung liegt im Bereich zwischen 4°C und 10°C. Diese 0,4% Erythrozytenlösung wird im folgenden "Suspension 1" genannt.

Das Hämolsat wird durch Zugabe von 40 µl der gewaschenen Erythrozyten zu 10 ml destilliertem Wasser mit einer Temperatur zwischen 4°C und 10°C erhalten und im folgenden als "Suspension 2" bezeichnet.

Als Standardantioxidanz wird 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetra-

methylchroman-2-carbonsäure (Trolox) in einer Konzentration von 6,4 mg in 25 ml 0,9% NaCl-Lösung verwendet.

Die zu untersuchenden Proben werden in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Die Reaktionslösung ("ABAP"), bestehend aus 136 mg ABAP in 3 ml gekühlter 0,9% NaCl-Lösung, muß unmittelbar vor dem Versuch frisch zubereitet und als letztes in die Wells pipettiert werden.

Differenzen der Gesamtvolumina werden durch 0,9% NaCl-Lösung ausgeglichen.

Fig. 10a zeigt die Resistenz von Erythrozyten gegenüber ABAP als zeitabhängigen Verlauf der Absorption bei 620 nm.

In den beiden oberen Kurven (A9 und A10) ist der zeitliche Absorptionsverlauf der Erythrozyten-Suspension mit und ohne Zusatz von ABAP dargestellt. Die Kurve A10 verdeutlicht die Stabilität der reinen Erythrozyten-Suspension ohne Zusatz von ABAP über den gesamten Zeitraum der Messung. Die Kurve A9 stellt die Reaktion von ABAP mit der Erythrozyten-Suspension dar. Durch die vom ABAP freigesetzten Radikale wird die Membran zerstört, die Hämolyse setzt ein, und es erfolgt eine Annäherung an die Kurve A11, welche die Einwirkung von ABAP auf das Hämolsat (Suspension 2) zeigt. Die gebildeten Radikale verursachen die Bildung von Methämoglobin. Die Kurve A12 veranschaulicht dagegen die Stabilität des Hämolsats über den gesamten Zeitraum der Messung.

Fig. 9b und 9c zeigen die Schutzwirkung von Antioxidantien, am Beispiel von Trolox in Form einer später einsetzenden Hämolyse bzw. Methämoglobinbildung.

Wie in Fig. 11 dargestellt, ergibt sich ein linearer Zusammenhang zwischen der eingesetzten Troloxmenge und der Zeit, die bis zum Einsetzen der Hämolyse vergeht.

Ausführungsbeispiel 4

Xanthin-Xanthinoxidase-Luminol-Chemilumineszenz Methode zur Bestimmung von Superoxidradikalfängern

Hypoxanthin und das Enzym Xanthinoxidase bilden Peroxidradikale. Als Indikator wird ebenfalls Luminol verwendet.

Gibt man das Enzym Superoxid-Dismutase (SOD) in die Reaktionslösung, wird die Radikalbildung in Abhängigkeit von der dazugegebenen Menge reduziert und die Intensität der Chemilumineszenz nimmt ab.

In die einzelnen Wells einer gekühlten Mikrotiterplatte werden räumlich getrennt voneinander die unterschiedlichen Proben und je 2 µl Xanthinoxidase (20 Units/ml in 20 ml 0,9% NaCl) pipettiert. Darauf werden in jedes Analysegefäß jeweils 100 µl Reaktionslösung, bestehend aus 9 ml 0,1 M Glycinpuffer pH 7,4 mit 1 ml 10 mM Hypoxanthin und 15 µl 10 mM Luminol, gegeben.

Die Mikrotiterplatte wird in einen an sich bekannten Mikrotiterplattenreader gebracht, geschüttelt sowie auf 37°C erwärmt. In einem Zeitraum von 15 Minuten wird in vorgegebenen Zeitabständen jeweils die Chemilumineszenz gemessen.

In Fig. 12 ist der gemessene Verlauf der Chemilumineszenz in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Wie der Legende zu entnehmen ist, wurden als Standard unterschiedlichen Mengen von SOD mit unterschiedlichen Aktivitäten untersucht. Es ist eine deutliche Abnahme der Intensität der Chemilumineszenz bei Proben mit höherer Aktivität gegenüber denen mit niedrigerer Aktivität zu erkennen.

Trägt man in Anlehnung an die Stern-Volmer-Gleichung I_0/I_i , wobei I_0 das Integral der Chemilumineszenz bei Abwesenheit und I_i das Integral der Chemilumineszenz bei Anwesenheit von SOD sind, gegen die SOD-Aktivität auf, erhält

man eine lineare Abhängigkeit. (Fig. 13). Diese kann zur Bestimmung der Antioxidanzkapazität von zu untersuchenden Proben genutzt werden.

Ausführungsbeispiel 5

Reaktion von H_2O_2 mit Myoglobin

Als radikalbildendes System wird H_2O_2 /Myoglobin und als Indikator, der radikalabhängig seine optischen Eigenschaften (Chemilumineszenz) ändert, Luminol eingesetzt.

Die Reaktionsmischung besteht aus 12,5 ml 0,1 M Glycinpuffer pH 8,6 mit 75 μ l H_2O_2 (6 μ l 30% H_2O_2 auf 10 ml dest. Wasser), 250 μ l Myoglobin (1 mg in 1 ml 0,9% NaCl) und 15,6 μ l 10 mM Luminol.

In die Wells der gekühlten Mikrotiterplatte werden 1 bis 5 μ l der zu untersuchenden Proben bzw. des Standards pipettiert. Dazu werden je 200 μ l der oben genannten Reaktionslösung gegeben und in einem an sich bekannten Mikrotiterplattenreader bei 37°C die Chemilumineszenz gemessen.

Fig. 14 zeigt den zeitlichen Verlauf der Chemilumineszenz in den einzelnen Wells der Mikrotiterplatte. In der Legende sind die Proben im einzelnen benannt.

Die Bestimmung der Antioxidanzkapazität von Proben erfolgt über die gemessene Verzögerungszeit mit einem bekannten Standard, wie z. B. Trolox.

Ausführungsbeispiel 6

Fluorimetrische Bestimmung der Antioxidanzkapazität

Die radikalbildende Substanz ist 2,2'-Azo-bis-2-amidinopropan (ABAP); als Indikator, der radikalabhängig seine optischen Eigenschaften (Fluoreszenz) ändert, wird ein Farbstoff, bestehend aus Poly-(benzyl-dimethylvinyl-benzylammoniumchlorid) und Sulforhodamin 101 (Ruby), eingesetzt.

Die Reaktionslösung besteht aus 170 mg ABAP und 100 μ l Ruby als Fluoreszenzindikator in 20 ml Pufferlösung (1 Teil 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4 und 9 Teile 0,9% NaCl) und muß unmittelbar vor der Verwendung frisch zubereitet werden (Temperatur: 4–15°C).

Die zu analysierenden Proben werden in die Wells einer Mikrotiterplatte pipettiert. Zur Blindwertbestimmung wird Wasser oder eine NaCl-Lösung verwendet.

In die einzelnen Wells mit den zu analysierenden Proben werden je 200 μ l der Reaktionslösung pipettiert. Die Platte wird dann sofort in einem an sich bekannten Mikrotiterplattenreader auf 37°C erhitzt, und bei 570 nm wird mit einer Excitationswellenlänge von 550 nm in bestimmten Zeitintervallen die Fluoreszenz gemessen.

Eine Lösung von Ruby in Wasser als Lösungsmittel fluoresziert bei einer Wellenlänge von ca. 604 nm (Excitationswellenlänge: 550 nm). Bei der später betrachteten Wellenlänge von 570 nm ist nur eine geringe Fluoreszenz zu beobachten.

Wie Fig. 15 zeigt, verschiebt sich die Fluoreszenzwellenlänge nach Zugabe von ABAP zeitabhängig in Richtung kleinerer Wellenlängen bei gleichzeitiger Zunahme der Intensität, was auf eine Beeinflussung des Indikators durch ABAP schließen läßt.

Der Beginn der zeitabhängigen Verschiebung der Fluoreszenz läßt sich durch Zugabe von Antioxidantien, wie z. B. Trolox (388 μ M), beeinflussen. Der Einfluß unterschiedlicher Troloxmengen ist in Fig. 16 dargestellt. Die Fluoreszenz wurde bei 570 nm (Excitationswellenlänge: 550 nm) gemessen. Die Abhängigkeit der Zeitverschiebung von der Troloxmenge ergibt einen linearen Zusammenhang (nicht dargestellt) und ist ebenfalls über die Verzö-

gerungszeit zur Bestimmung der Antioxidanzkapazität von zu untersuchenden Proben geeignet.

Bezugszeichenliste

- 1 Analysengefäße (Wells)
- 2 Mikrotiterplatte
- 3 Grundkörper
- 4 Vertiefungen
- 5 Heizspiralen
- A_p Antioxidanzkapazität der Probe
- A_0 Antioxidanzkapazität der Reaktionsmischung ohne Probe
- A_s Antioxidanzkapazität eines Standards
- τ Verzögerungszeit
- τ_p Verzögerungszeit der Probe
- τ_s Verzögerungszeit des Standards
- τ_0 Verzögerungszeit der Reaktionsmischung ohne Probe
- C_s Konzentration des Standards
- SF Stöchiometriefaktor der Radikalbildung
- I_0 Integral des optischen Signals für die Reaktionsmischung ohne Probezusatz
- I_p Integral des optischen Signals für die Probe
- I_s Integral des optischen Signals für Standard

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung der Antioxidanzkapazität in Proben, **dadurch gekennzeichnet**, daß mit den Proben in einer Pluralität von in einem vorgegebenen x-y-Raster angeordneten gekühlten Analysengefäßen Mischungen hergestellt werden, die weiterhin jeweils
 - a) aus zumindest einem System, welches temperaturabhängig freie Radikale bildet, und
 - b) aus zumindest einem Indikator, der radikalabhängig seine optischen Eigenschaften ändert,
 bestehen, daß die Mischungen in den gekühlten Analysengefäßen zunächst auf eine im wesentlichen gleiche Analysen-Ausgangstemperatur zwischen 0 und ca. 20°C gebracht und anschließend, vorzugsweise in einem Zeitraum von bis zu 60 min., gleichmäßig auf eine Temperatur bis höchstens ca. 90°C erwärmt werden, daß während der Erwärmung der Mischungen in den Analysengefäßen mit einer an sich bekannten Readeranordnung in den Mischungen der zeitliche Verlauf der Änderung der optischer Eigenschaften erfaßt wird, und daß aus dieser Änderung die Antioxidanzkapazität durch Vergleich mit bekannten Referenzwerten bestimmt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß zumindest in einem der Analysengefäße eine Substanz mit definierter Antioxidanzkapazität in einer Referenzmischung der gleichen Temperaturerhöhung ausgesetzt wird wie die in ihrer Antioxidanzkapazität zu bestimmenden Mischungen und daß die Antioxidanzkapazität der zu bestimmenden Mischungen über die Änderung deren optischer Eigenschaften im Vergleich zur Änderung der optischer Eigenschaften in der Referenzmischung ermittelt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als temperaturabhängig freie Radikale bildendes System 2,2'-Azo-bis-2-amidinopropan (ABAP) verwendet wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das temperaturabhängig freie Radikale bildende System der Mischungen aus Xanthinoxidase mit Hypoxanthin als Substrat gebildet wird.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,

net, daß als temperaturabhängig freie Radikale bildendes System H_2O_2 eingesetzt wird.

6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Indikator, der radikalabhängig seine optischen Eigenschaften ändert, Luminol verwendet wird. 5

7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Indikator, der radikalabhängig seine optischen Eigenschaften ändert, 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) verwendet wird.

8. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Indikator, der radikalabhängig seine optischen Eigenschaften ändert, eine Erythrozytensuspension verwendet wird. 10

9. Verfahren nach den Ansprüchen 1, 3 und 6 bzw. 7 dadurch gekennzeichnet, daß in allen Reaktionsmischungen eines Analysenansatzes eine definierte im Vergleich zur Probe und dem Standard kleine Antioxidanzkonzentration eingestellt wird. 15

10. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Indikator, der radikalabhängig seine optischen Eigenschaften ändert, Poly-(benzyltrimethylvinylbenzylammoniumchlorid) und Sulforhodamin 101(Ruby) verwendet wird. 20

11. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Temperatur der Mischungen sprunghaft erhöht wird. 25

12. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Temperatur der Mischungen kontinuierlich erhöht wird.

13. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Temperatur der Mischungen mit konkaver Temperatur-Zeitfunktion erhöht wird. 30

14. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Temperatur der Mischungen mit konvexer Temperatur-Zeitfunktion erhöht wird. 35

15. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die im x-y-Raster einer an sich bekannten Mikrotiterplatte (2) angeordneten Analysengefäße (1) aus formnachgiebigem Material bestehen, das kraft- und formschlüssig in einen metallischen, die Analysengefäße (1) als lagekorrespondierende Vertiefungen (4) aufweisenden sowie temperierbaren Grundkörper (3) eingesetzt ist. 40

16. Vorrichtung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß der Grundkörper (3) im thermischen Kontakt mit Mitteln (5) zu deren Temperierung steht. 45

17. Vorrichtung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Mittel zur Temperierung des Grundkörpers (3) aus elektrischen Heizelementen, beispielsweise einer oder mehreren im oder am Grundkörper (3) angebrachten Heizspiralen (5), bestehen. 50

18. Vorrichtung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Mittel zur Temperierung des Grundkörpers (3) aus fluiden Medien, z. B. Wasser, welches den Grundkörper (3) durchströmt, bestehen. 55

19. Vorrichtung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß für colorimetrische Messungen an den Mischungen die Analysengefäße (1) aus lichtdurchlässigem Material bestehen und die Vertiefungen (4) im Grundkörper (3) als durchgängige Bohrungen ausgeführt sind. 60

Hierzu 16 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

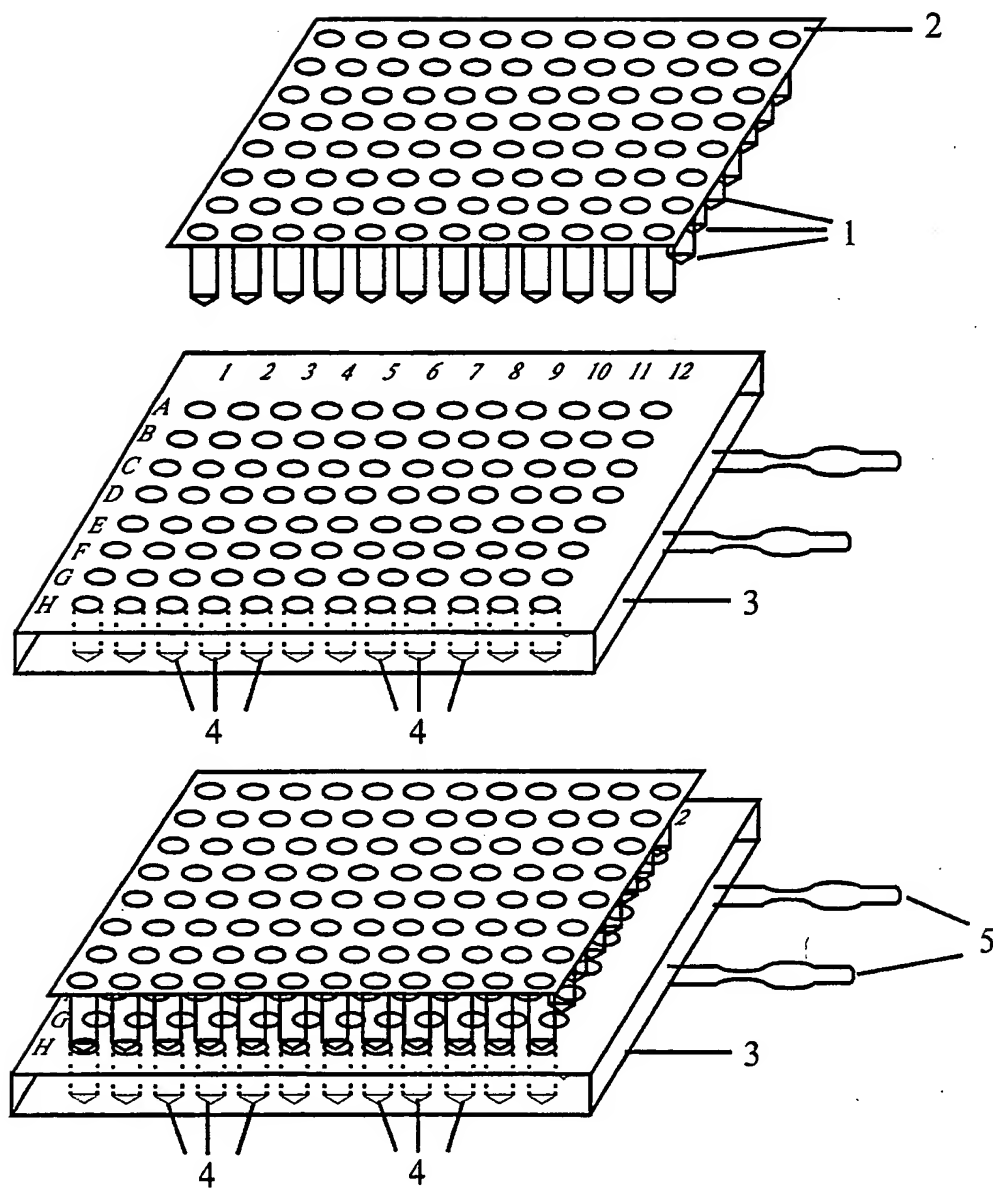
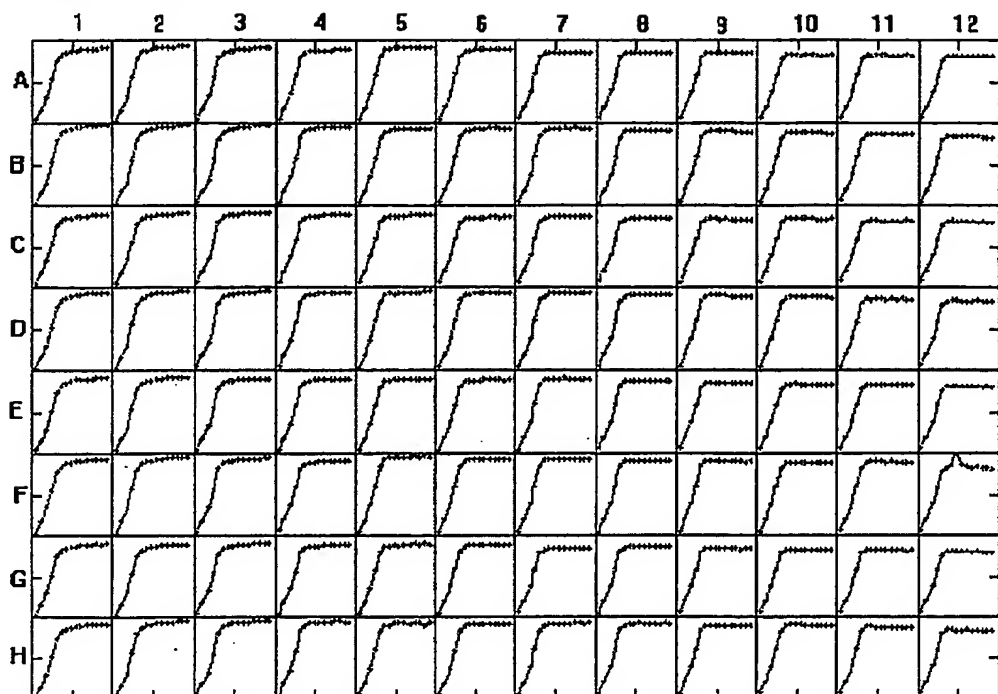


Fig. 1

Temperatur [°C]



Zeit [min]

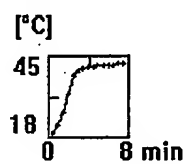


Fig. 2

Zyklus	Zeit [min]	T [°C] F11
1	0.4	19.68
2	0.9	22.95
3	1.5	28.35
4	2.0	34.25
5	2.5	40.61
6	3.0	42.25
7	3.5	42.50
8	4.0	42.39
9	4.4	42.45
10	4.9	42.28
11	5.4	42.32
12	5.9	42.25
13	6.4	42.28
14	6.9	42.24
15	7.4	42.25

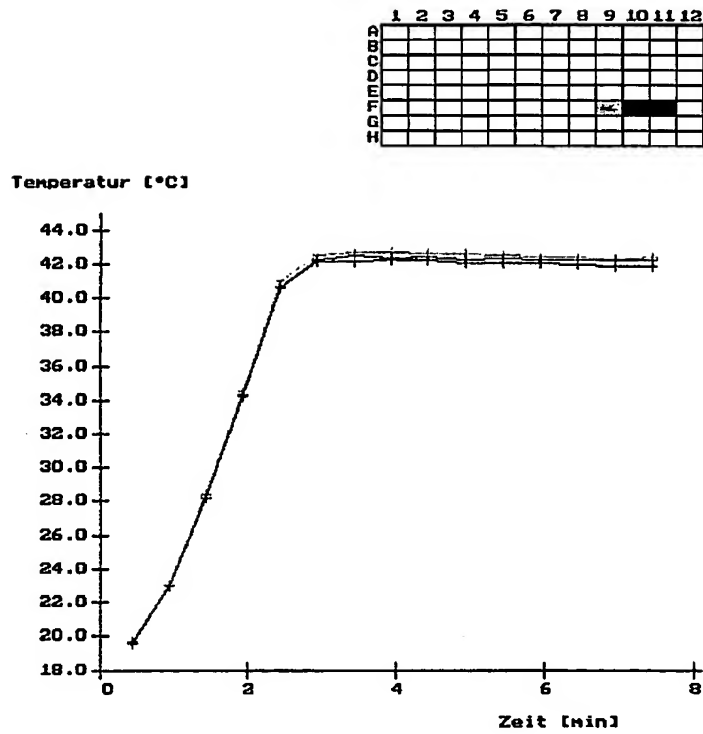
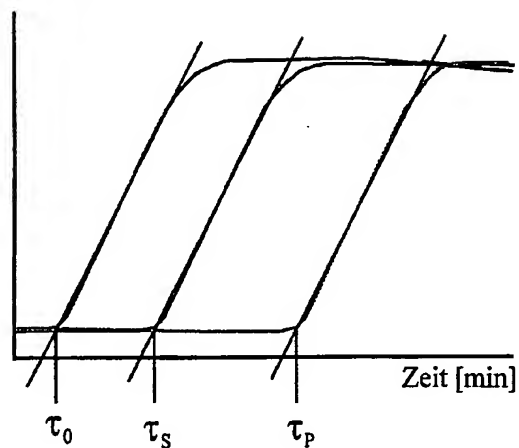


Fig. 3

a) Bestimmung der Verzögerungszeit

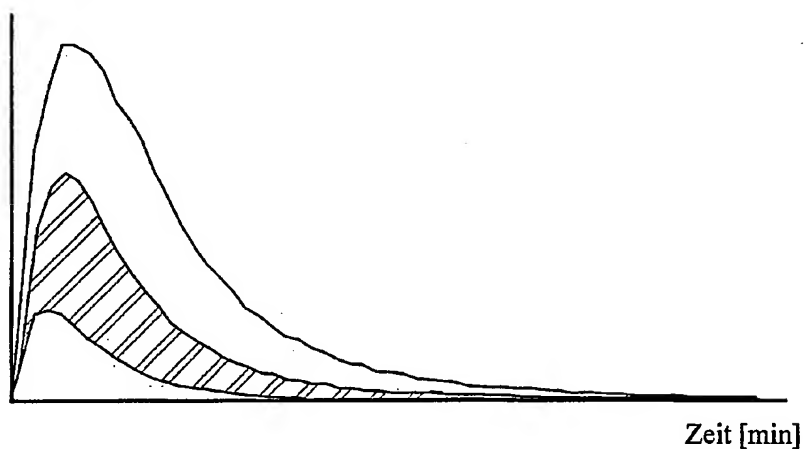
Optisches Signal



- τ_0 Verzögerungszeit des Blindwerts
 τ_s Verzögerungszeit des Standards
 τ_p Verzögerungszeit der Probe

b) Bestimmung des Integrals des optischen Signals

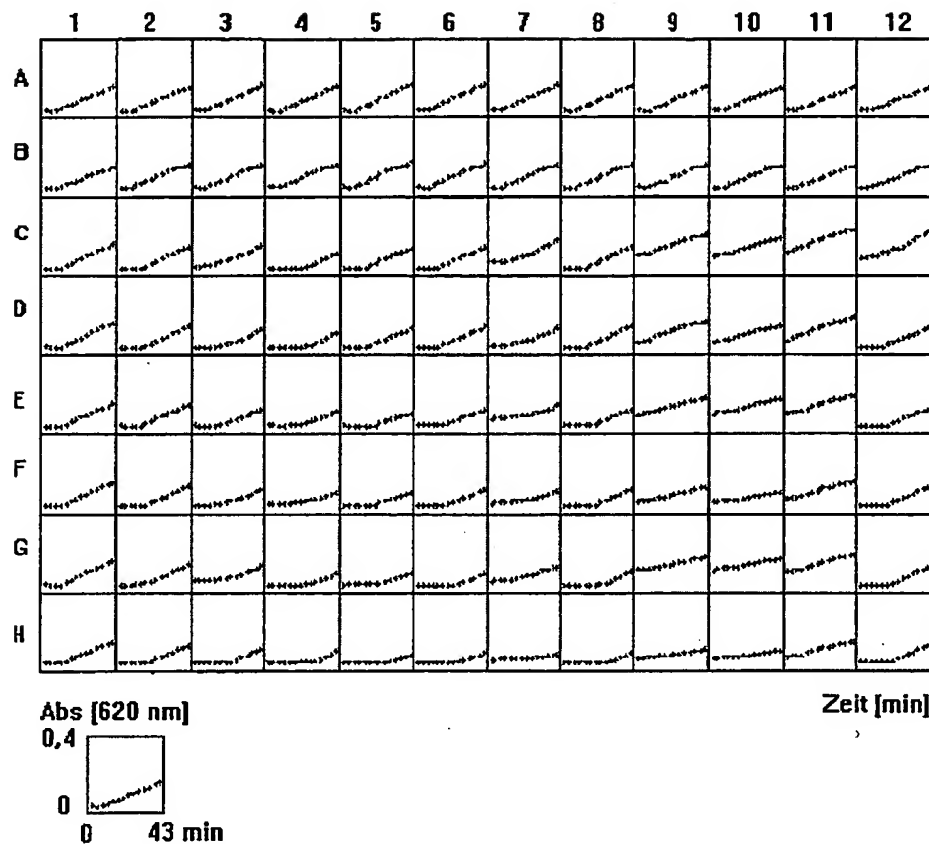
Optisches Signal



- ☐ Blindwert = I_0
☐ Standard = I_s
☒ Probe = I_p

Fig. 4

Absorbanz bei 620 nm



Legende:

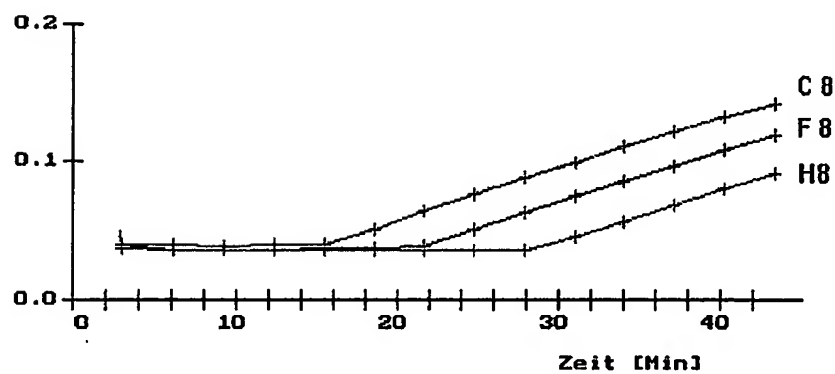
A1-B12:	ohne Zusatz (Blindproben)	C8-D8:	1 µl Harnsäure (400 µM)
C1-E1:	3 µl Trolox (376 µM)	E8-F8:	2 µl Harnsäure (400 µM)
F1-H1:	5 µl Trolox (376 µM)	G8-H8:	3 µl Harnsäure (400 µM)
C2-E2:	7 µl Trolox (376 µM)	C9-D9:	1 µl Albumin (5%)
F2-H2:	9 µl Trolox (376 µM)	E9-F9:	2 µl Albumin (5%)
C3-E3:	11 µl Trolox (376 µM)	G9-H9:	3 µl Albumin (5%)
F3-H3:	13 µl Trolox (376 µM)	C10-E10:	1 µl Serum (unverdünnt)
C4-E4:	15 µl Trolox (376 µM)	F10-H10:	2 µl Serum (unverdünnt)
F4-H4:	17 µl Trolox (376 µM)	C11-D11:	5 µl Serum (1:10 verdünnt)
C5-D5:	1 µl Catechin (200 µM)	E11-F11:	8 µl Serum (1:10 verdünnt)
E5-F5:	2 µl Catechin (200 µM)	G11-H11:	10 µl Serum (1:10 verdünnt)
G5-H5:	3 µl Catechin (200 µM)	C12-D12:	1 µl Ascorbinsäure (400 µM)
C6-D6:	1 µl Propylgallat (200 µM)	E12-F12:	2 µl Ascorbinsäure (400 µM)
E6-F6:	2 µl Propylgallat (200 µM)	G12-H12:	3 µl Ascorbinsäure (400 µM)
G6-H6:	3 µl Propylgallat (200 µM)		
C7-D7:	1 µl Bilirubin (400 µM)		
E7-F7:	1 µl Bilirubin (400 µM)		
G7-H7:	1 µl Bilirubin (400 µM)		

Fig. 5

a) Harnsäure

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Absorbanz



b) Catechin

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Absorbanz

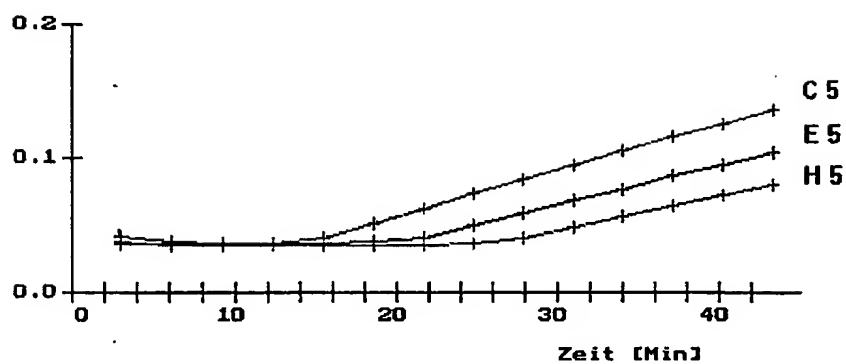


Fig. 6

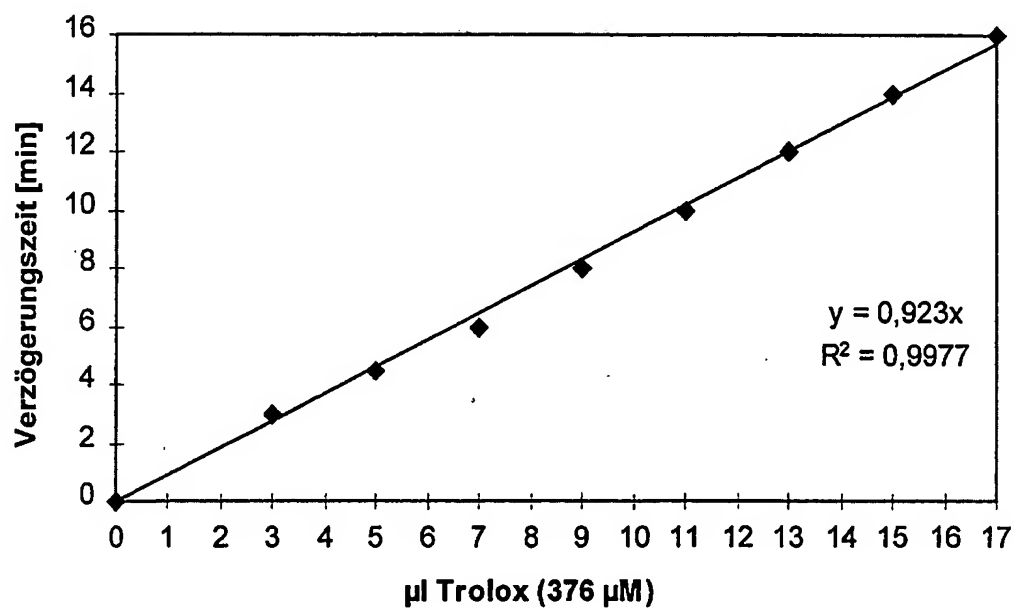
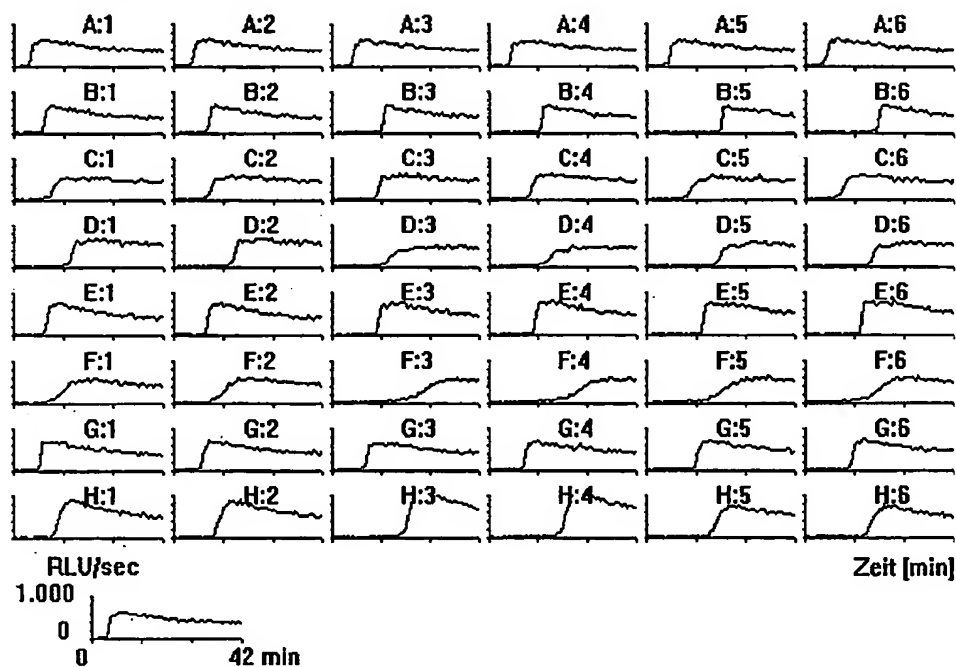


Fig. 7

Chemilumineszenz [RLU/sec]



Legende:

- A1 - A6: 1 - 10 μ l Wasser als Blindwert
 B1 - B2: 0,5 μ l Trolox (376 μ M)
 B3 - B4: 1 μ l Trolox (376 μ M)
 B5 - B6: 2 μ l Trolox (376 μ M)
 C1 - C2: 1 μ l Serum von Patient A der Intensivstation
 C3 - C4: 1 μ l Serum von Patient B der Intensivstation
 C5 - C6: 1 μ l Serum von Patient C der Intensivstation
 D1 - D2: 1 μ l Serum einer gesunden Vergleichsperson
 D3 - D4: 2 μ l Serum von Patient D der Intensivstation
 D5 - D6: 2 μ l Serum von Patient E der Intensivstation
 E1 - E2: 1 μ l Ascorbinsäure (400 μ M)
 E3 - E4: 2 μ l Ascorbinsäure (400 μ M)
 E5 - E6: 2,7 μ l Ascorbinsäure (400 μ M)
 F1 - F2: 2 μ l Portugiesischer Rotwein 1:100 mit Wasser verdünnt
 F3 - F4: 4 μ l Portugiesischer Rotwein 1:100 mit Wasser verdünnt
 F5 - F6: 4 μ l Italienischer Rotwein 1:100 mit Wasser verdünnt
 G1 - G2: 7 μ l mit Urin kontaminiertes Wasser (1:100)
 G3 - G4: 10 μ l mit Urin kontaminiertes Wasser (1:500)
 G5 - G6: 10 μ l mit Urin kontaminiertes Wasser (1:200)
 H1 - H2: 1 μ l Bilirubin (400 μ M)
 H3 - H4: 2 μ l Bilirubin (400 μ M)
 H5 - H6: 1,5 μ l Propylgallat (200 μ M)

Fig. 8

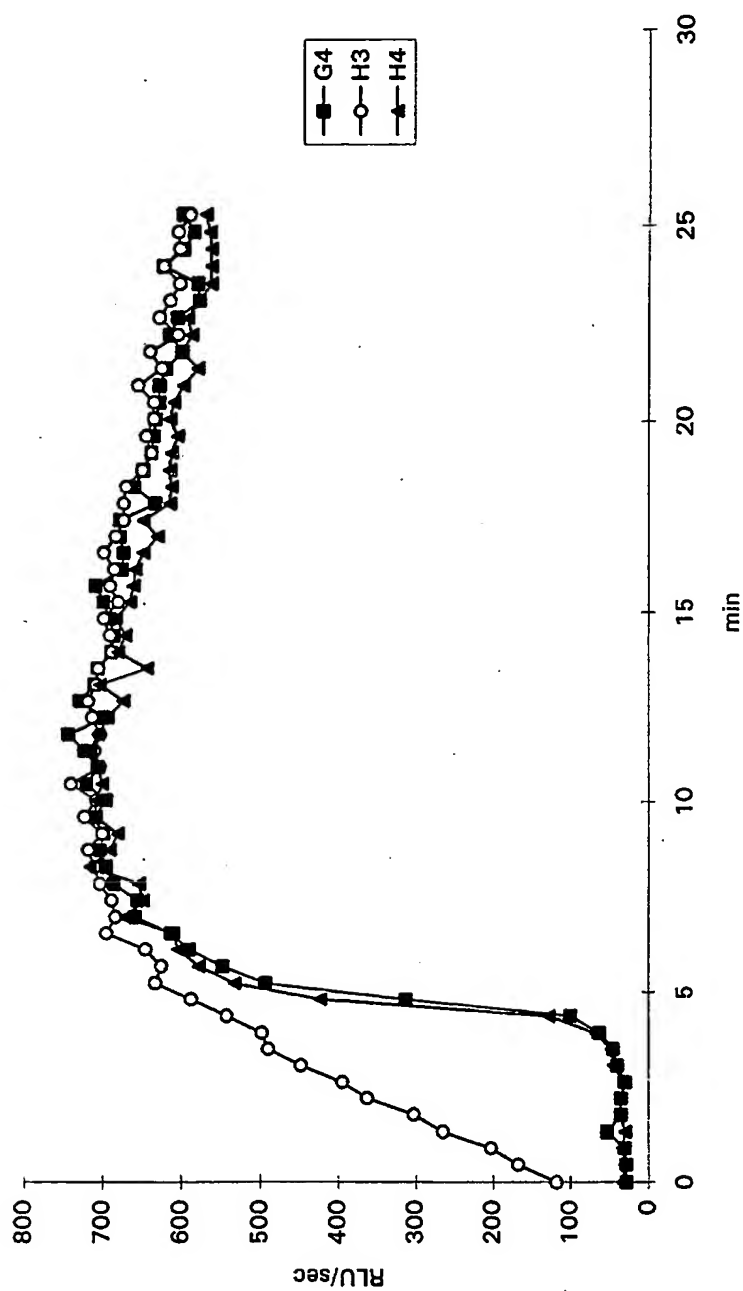
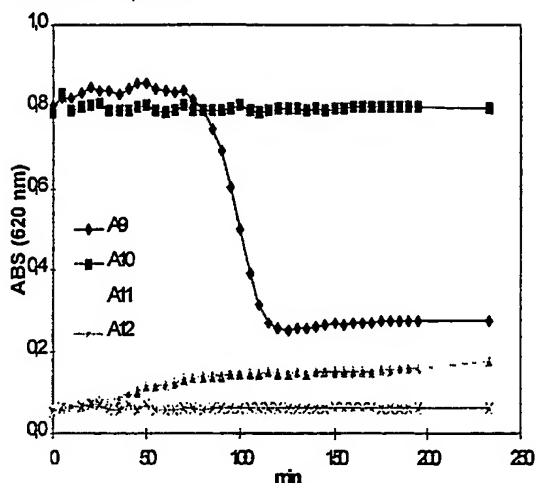


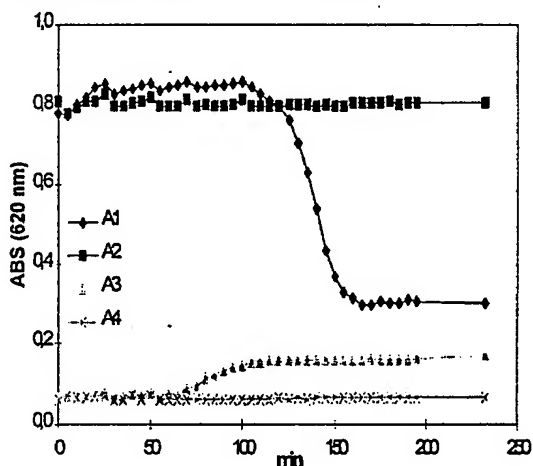
Fig. 9

a) ohne Zusatz

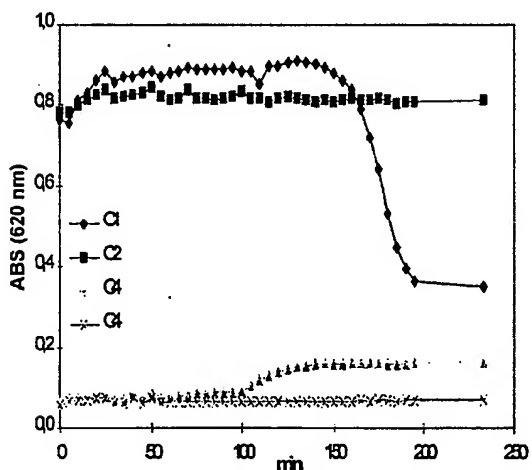


Legende:

- A9: 40 μ l NaCl - Lösung
160 μ l Suspension 1
40 μ l ABAP
A10: 40 μ l NaCl - Lösung
160 μ l Suspension 1
40 μ l NaCl - Lösung
A11: 40 μ l NaCl - Lösung
160 μ l Suspension 2
40 μ l ABAP
A12: 40 μ l NaCl - Lösung
160 μ l Suspension 2
40 μ l NaCl - Lösung

b) Zugabe von 10 μ l Trolox

- A1: 10 μ l Trolox und 30 μ l NaCl - Lösung
160 μ l Suspension 1
40 μ l ABAP
A2: 10 μ l Trolox und 30 μ l NaCl - Lösung
160 μ l Suspension 1
40 μ l NaCl - Lösung
A3: 10 μ l Trolox und 30 μ l NaCl - Lösung
160 μ l Suspension 2
40 μ l ABAP
A4: 10 μ l Trolox und 30 μ l NaCl - Lösung
160 μ l Suspension 2
40 μ l NaCl - Lösung

c) Zugabe von 20 μ l Trolox

- C1: 20 μ l Trolox und 20 μ l NaCl - Lösung
160 μ l Suspension 1
40 μ l ABAP
C2: 20 μ l Trolox und 20 μ l NaCl - Lösung
160 μ l Suspension 1
40 μ l NaCl - Lösung
C3: 20 μ l Trolox und 20 μ l NaCl - Lösung
160 μ l Suspension 2
40 μ l ABAP
C4: 20 μ l Trolox und 20 μ l NaCl - Lösung
160 μ l Suspension 2
40 μ l NaCl - Lösung

Fig. 10

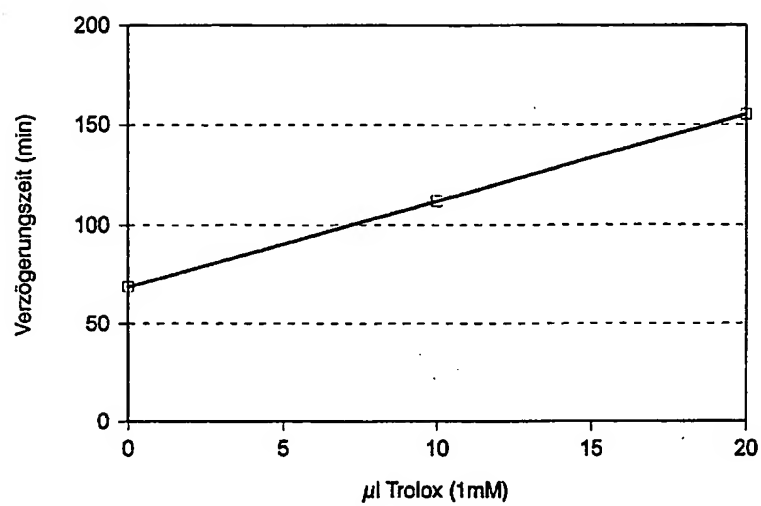
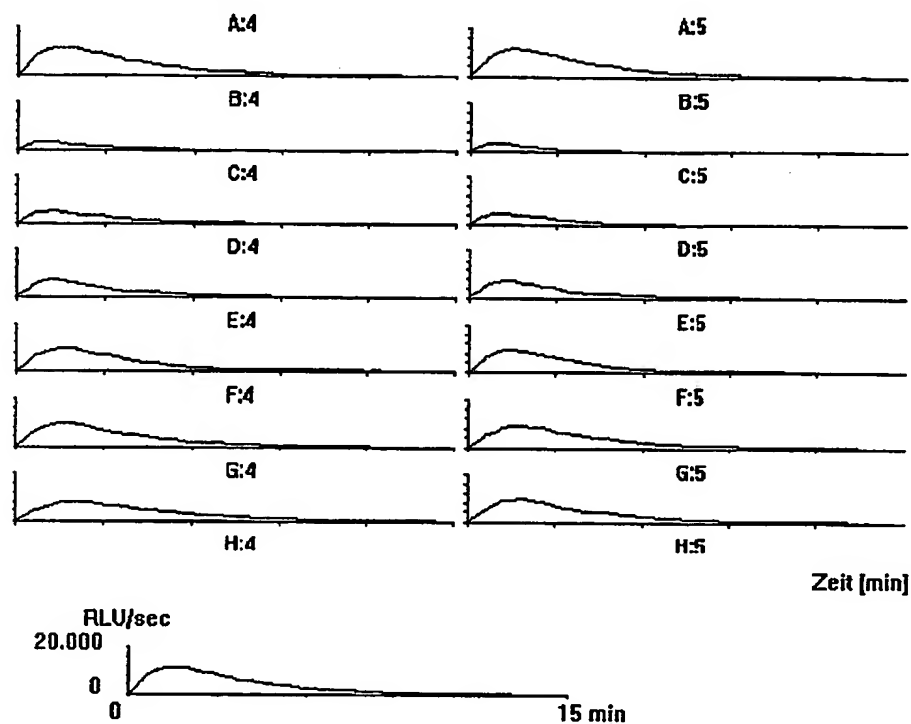


Fig. 11

Chemilumineszenz [RLU/sec]



Legende:

A4 und A5	2 µl NaCl-Lösung
B4 und B5	2 µl Superoxid-Dismutase (SOD): 96 mUnits/ml
C4 und C5	1 µl Superoxid-Dismutase (SOD): 96 mUnits/ml
D4 und D5	2 µl Superoxid-Dismutase (SOD): 24 mUnits/ml
E4 und E5	2 µl Superoxid-Dismutase (SOD): 9,6 mUnits/ml
F4 und F5	1 µl Superoxid-Dismutase (SOD): 9,6 mUnits/ml
G4 und G5	0,5 µl Superoxid-Dismutase (SOD): 9,6 mUnits/ml
H4 und H5	2 µl Serum gelöst in 0,9 % NaCl-Lösung 1:50

Fig. 12

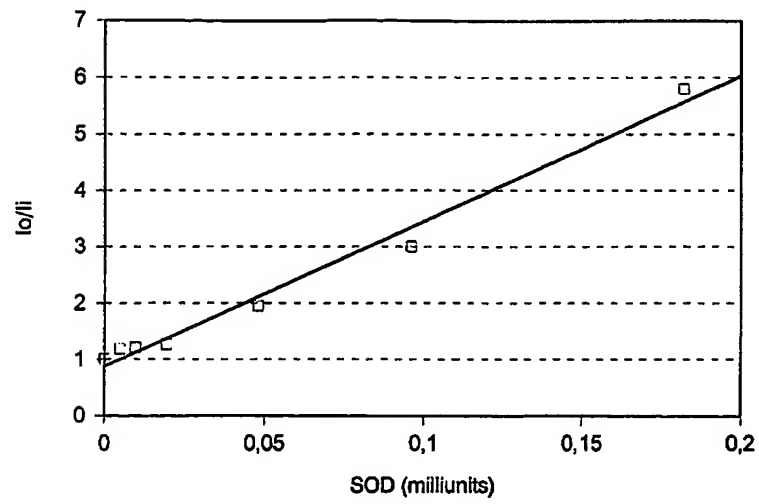
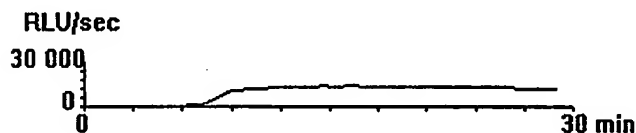
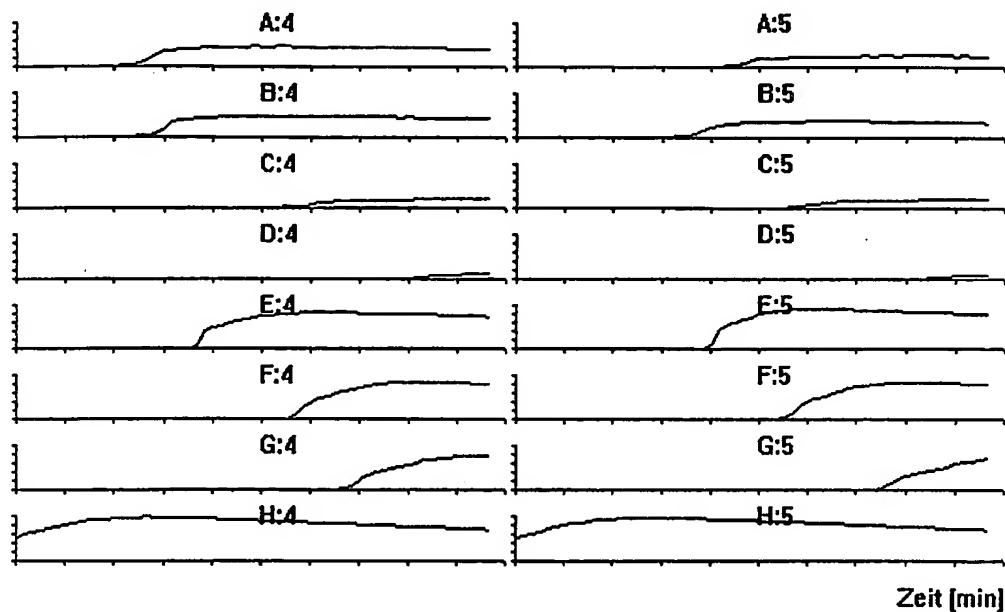


Fig. 13

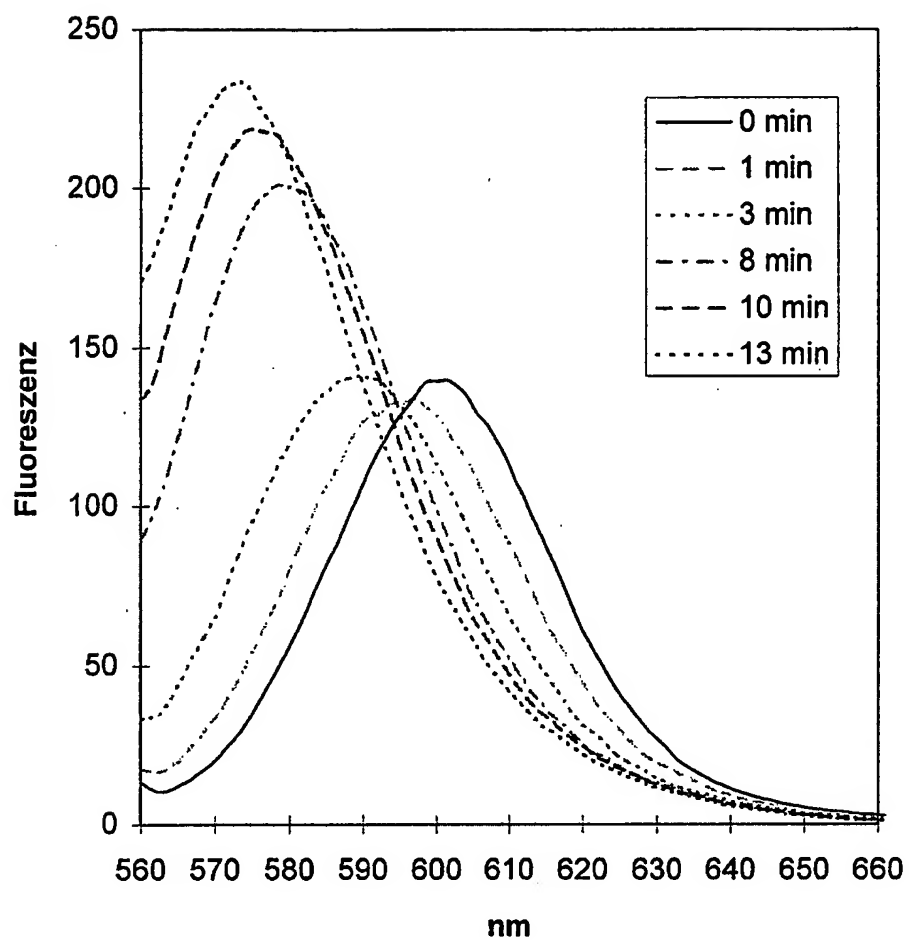
Chemilumineszenz [RLU/sec]



Legende:

- A4: 1 µl Blutserum einer gesunden Vergleichsperson K1
- A5: 1 µl Blutserum einer gesunden Vergleichsperson K2
- B4: 1 µl Blutserum einer gesunden Vergleichsperson K3
- B5: 1 µl Blutserum einer gesunden Vergleichsperson K4
- C4: 2 µl Blutserum einer gesunden Vergleichsperson K5
- C5: 2 µl Blutserum einer gesunden Vergleichsperson K5
- D4: 2 µl Blutserum eines Patienten mit einer Nierenerkrankung P1
- D5: 2 µl Blutserum eines Patienten mit einer Nierenerkrankung P2
- E4: 1 µl Trolox (388 µM)
- E5: 1 µl Trolox (388 µM)
- F4: 1,5 µl Trolox (388 µM)
- F5: 1,5 µl Trolox (388 µM)
- G4: 2 µl Trolox (388 µM)
- G5: 2 µl Trolox (435 µM)
- H4: 2 µl NaCl (0,9%)
- H5: 2 µl NaCl (0,9%)

Fig. 14



$\lambda_{\text{exc}}=550 \text{ nm}$

Fig. 15

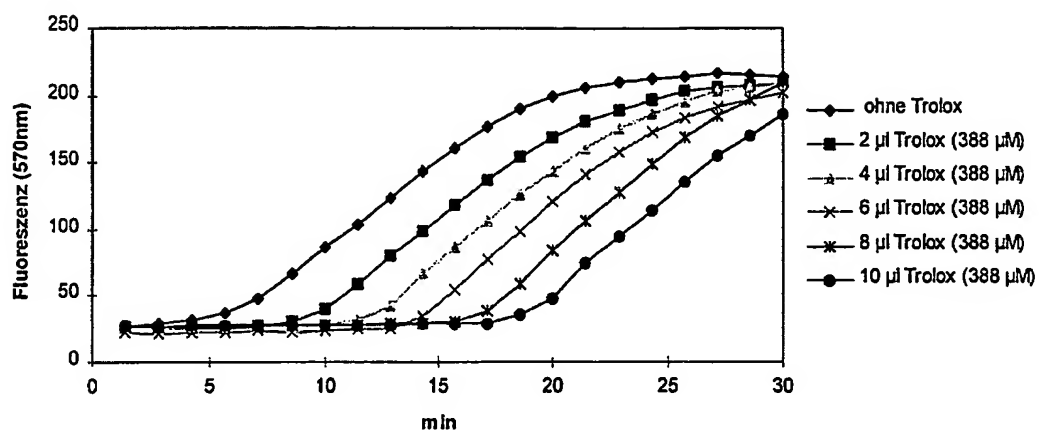
 $\lambda_{exc}=550 \text{ nm}$

Fig. 16

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.